

Az extracelluláris vezikulák és citokinek kölsönhatásának vizsgálata

Doktori értekezés

Dr. Szabó Géza Tamás

Semmelweis Egyetem

Molekuláris orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Buzás Edit, az MTA doktora, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Kristóf Katalin, PhD, egyetemi docens, főorvos

Dr. Vellai Tibor, az MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Schaff Zsuzsa, az MTA tagja, professor emerita

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Bajtay Zsuzsa, az MTA doktora, habil. egy. docens

Dr. Várnai Péter, az MTA doktora, egyetemi tanár

Budapest

2016

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	1
Rövidítések jegyzéke	7
1 Bevezetés	16
1.1 Az extracelluláris vezikulák (EVk) alapvető jellemzői	16
1.1.1 Az EVk felépítése	16
1.1.2 Az EVk típusai	18
1.1.3 Az EVk kibocsátásának mechanizmusa	20
1.2 Az EVk tanulmányozása révén megszerzett ismereteink gyógyászati felhasználásának távlatai	23
1.2.1 Az EVk jellemzői, amelyek lehetővé teszik, hogy befolyásoljanak élettani folyamatokat	23
1.2.2 Az EVk vizsgálatának diagnosztikai jelentősége	25
1.2.3 Az EVk, mint a terápia eszköze	28
1.3 Az EVk klinikai felhasználását hátráltató ellentmondásos kísérleti adatok	29
1.3.1 A vizsgálati módszerek korlátai	29
1.3.2 Az EV preparátumok heterogenitása	31
1.3.3 Az oldott állapotú jelátvivők hatásának figyelmen kívül hagyása	32
1.4 Oldott állapotú hírvivők és EVk közötti kölcsönhatás lehetősége	33
1.4.1 EVk lehetséges szerepe oldott állapotú hírvivők által meghatározott biológiai folyamatokban	33
1.4.2 Az EVk jelentősége az antigének bemutatásában	34
1.4.3 Lehetséges kölcsönhatás a citokinek és az EVk között	37
2 Célkitűzések	40
I. A CCRF humán T-sejtes sejtvonal kondicionált médiumában található EVk és citokinek jellemzése	40

II. A T-sejtek által kibocsátott EVk és a rekombináns TNF együttes jelenlétének monocita sejtek génátíródására gyakorolt hatásának vizsgálata	41
III. A globális génexpressziós vizsgálat során megfigyelt változások biológiai jelentősége	42
IV. A génkifejeződés megfigyelt változásaihoz köthető lehetséges effektormolekulák azonosítása	42
3 Anyagok és módszerek	43
3.1 A vizsgált sejtek és EVk	43
3.1.1 Sejtvonalak és fenntartásuk	43
3.1.2 EV-tartalmú és EV-mentes felülszó előállítása	43
3.1.3 U937 sejtek tenyésztése EVk, TNF vagy a két tényező együttes jelenlétében	44
3.1.4 EV preparátumok előállítása	44
3.1.5 TNF citokint csak a felszínükön hordozó MV preparátumok előállítása	45
3.2 Az EV preparátumok minőségellenőrzése	46
3.2.1 Áramlási citometria	46
3.2.2 Elektronmikroszkópia	47
3.2.3 Coulter-elv szerinti részecskeszámlálás	47
3.2.4 Az EV-preparátumokat szennyező TNF jelenlétének kizárása	48
3.3 Az EVk jelenlétében tapasztalható biológiai válaszok vizsgálata	48
3.3.1 RNS izolálás	48
3.3.2 Génexpressziós microarray vizsgálat	48
3.3.3 qRT-PCR ⁴⁹	
3.3.4 U937 sejtek által termelt citokinek mennyiségének mérése	49
3.3.5 Kemotaktikus aktivitás felmérése	49
3.4 Adatelemzés	50
3.4.1 A microarray adatainak statisztikai értékelése	50
3.4.2 A génkifejeződés szignifikáns változásához köthető funkcionális kategóriák keresése	51

3.4.3 Génhalmaz alapú elemzés (GSEA)	51
3.4.4 Az egyedi génekre összpontosító kísérletek eredményeinek statisztikai értékelése	52
3.4.5 Az EVk és MVk által szállított fehérjék, illetve miRNS molekulák azonosítása	53
3.4.6 Adatbázislekérdezések automatizálása és az azonosítók megfeleltetése	53
3.5 Az eredmények szemléletes ábrázolása	54
3.5.1 Egy EV méretarányos modelljének ábrázolása	54
3.5.2 A génkifejeződés alapján hasonlónak mutakozó csoportok hő térképés ábrázolásmódja	54
3.5.3 Egyes fehérjék közötti kapcsolatok hálózatos ábrázolása	55
3.5.4 Táblázatok és grafikonok	55
4 Eredmények	56
4.1 CCRF humán T-sejtes sejtvonal kondicionált felülúszójának jellemzői	56
4.1.1 Az EVk jelenlétének kimutatása a sejtvonal felülúszójában és jellemzőik	56
4.1.2 Az EVk sikeres eltávolításának ellenőrzése	58
4.1.3 TNF kimutatása az EV preparátumokból	59
4.2 A CCRF T-sejtes sejtvonal által kibocsátott EVk és a TNF kombinatorikus hatása az U937 monocita sejtvonal génexpressziójára	60
4.2.1 A vizsgált tényezők jelenlétében szignifikáns transzkripció változást elszenvedő gének azonosítása	60
4.2.2 A génátíródás változásának mintázata alapján felállított géncsoportok (klaszterek)	65
4.2.3 A génátíródás változásának megerősítése az egyedi gének szintjén	67
4.2.4 A sejtfelülúszóban található EVk jelenlétében megfigyelt hatások igazolása izolált EVk felhasználásával	70
4.3 Az EVk, illetve a TNF jelenlétében megfigyelt változásokkal összefüggésbe hozható biológiai folyamatok	72
4.3.1 A szignifikáns változást mutató génekhez köthető biológiai folyamatok	72
4.3.2 A génkifejeződés változása által halmozottan érintett géncsoportok	76
4.3.3 Az MVk hatása az U937 sejtek kemoattraktáns potenciáljára	83

4.4	Az EVk által a kísérleti rendszerünkben előidézett változásokért felelőssé tehető mechanizmusok felderítése	84
4.4.1	A MVk felszíne és a TNF között kialakuló fizikai kapcsolat lehetőségének kizárása	84
4.4.2	Az MVk által szállított fehérjék azonosítása a szakirodalom elemzése alapján	85
4.4.3	Az EVk, illetve MVk által szállított fehérjék lehetséges szerepe a kísérleti elrendezésünkben	87
4.4.4	Az EVk által szállított miRNS molekulák lehetséges szerepének vizsgálata az EVk és a TNF közötti kölcsönhatás hátterében	91
5	Megbeszélés	95
5.1	Az intakt EVk forrású kondicionált médiumot használó kísérleti rendszer értékelése	95
5.1.1	A CCRF humán T-sejtes sejtvonal kondicionált sejtfelülszóját alkalmazó kísérleti rendszer felállításának indokai	95
5.1.2	A CCRF humán T-sejtes sejtvonal nyugvó sejtjei által kibocsátott EVk jellemzés	97
5.2	Az EVk és a TNF génkifejeződésre gyakorolt hatásának összevetése	98
5.2.1	Az EVk és a TNF jelenlétében megfigyelt globális génexpressziós változások	98
5.2.2	A génkifejeződés globális változásainak reprodukálhatósága az egyedi gének szintjén	99
5.2.3	Az intakt EVk és az izolált MVk hatásának összevetése	100
5.2.4	Az EVk és a TNF hatása közötti kölcsönhatás természete	101
5.3	Az EVk és a TNF kölcsönhatása által legjobban érintett biológiai folyamatok	102
5.3.1	Az EVk jelenlétében szignifikáns mértékben megváltozott egyes gének lehetséges biológiai szerepe	102
5.3.2	Az EVk és a TNF jelenlétében bekövetkező globális génexpressziós változások által érintett biológiai folyamatok	103
5.4	A TNF és MVk közötti kölcsönhatás és feltételezhető háttere	104

5.4.1 Fehérjék vezikuláris átvitelének lehetséges szerepe a TNF jelátvitel befolyásolásában	104
5.4.2 Az EVk és a MVk fehérjekészletének proteomikai elemzése	105
5.4.3 A MVk által szállított fehérjék lehetséges szerepe a TNF jelátvitelében	105
5.4.4 Az EVk jelenlétében létrejövő változásokért felelőssé tehető miRNS molekulák	107
5.4.5 Az EVk jelenlétében létrejövő változások hasonlósága az oxidált foszfolipidek esetében megfigyelt hatással	108
6 Következtetések	109
6.1 A CRRF sejtvonal felülszójában található EVk és citokinek	109
6.2 Az EVk és TNF jelenlétében megfigyelt génexpressziós változások	109
6.3 Az EVk jelenléte által feltételezhetően befolyásolt biológiai folyamatok	110
6.4 Az EVk és MVk TNF jelátvitel szempontjából vélhetően releváns tulajdonságainak felderítése	111
7 Összefoglalás	113
8 Summary	114
9 Irodalom	115
10 Saját publikációk jegyzéke	150
10.1 A dolgozat témájához kapcsolódó közlemények	150
10.2 A dolgozat témájához nem kapcsolódó közlemények	150
11 Köszönetnyilvánítás	151

Rövidítések jegyzéke

ABLIM	Aktin filamentekhez kötődő LIM (egy cinkujjas doménnel rendelkező) citoskeletális fehérje
ADAMDEC	ADAM-szerű (szecernált metalloproteinázok családjába tartozó) decysin fehérje
AKAP	A-kinázt (pl. a PKA kinázt) horgonyzó fehérje
AKT	Szerinre és treoninra specifikus fehérjekinázok családja
ALG	Az UDP-N-acetilglukózamin transzferáz egyes alegységei
ALIX	Az ALG2 fehérje interakciós partnere, más néven programozott sejthalál 6 fehérét kötő fehérje (PDCD6IP)
ANOVA	Varianciaanalízis
AP3B2	Az AP3 (egy clathrin adapter fehérje) egyik alegysége
APITD1	Apoptózis indukáló, TAF9 (RNS-polimeráz-szerű) doménnel rendelkező fehérje, mely a centomer komplex tagja, más néven Centromer-S
BAG4	A BCL2 antiapoptotikus fehérjéhez kötődő athanotogén (apoptózist gátló) fehérje
BCL	B-sejtes limfóma által kódolt fehérjék családja (pl. az antiapoptotikus BCL2 és BCL3)
BCL2A1	A BCL2 fehérje A1 interakciós partnere
BCR	B-sejt receptor
BIRC	Baculovirális IAP (apoptózist gátló) ismétlődést tartalmazó fehérjék családja
BLNK	B-sejteket összekötő fehérje, egy BCR jelátvitelben szerepet játszó adaptor fehérje
BOLA3	Egy az <i>Escherichia coli</i> BolA DNS-kötő fehérjéjéhez hasonlító emberi fehérje
cAMP	ciklikus adenosin-monofoszfát
CASK	Kalcium/calmodulin-függő szerin fehérjekináz, mely a szinaptikus ioncsatornák lehorgonyzásáért felelős.

CASP	Az apoptózis folyamatában fontos szerepet játszó kaszpázok családja (pl. CASP3, CASP8)
CCDC	Szuperhélix ("coiled coil") domént tartalmazó fehérjék
CCL	Egy CC (két szomszédos cisztein) motívumot tartalmazó kemokin ligand (pl. CCL2)
CCRF-CEM	A Gyermekrák Kutatási Alapítvány (Children's Cancer Research Foundation) által a CEM monogrammu páciensből nyert akut limfoblasztos leukémia sejtvonal
CD	Sejtfelszíni antigének (Cluster of Differentiation, pl. CD9)
CEBPB	A CCAAT enhancer DNS szekvenciához kötődő béta fehérje
CFLAR	A kaszpáz 8 és a FADD fehérjék regulátora
CHI3L	Kitináz 3-szerű fehérje
CHRNA	Nikotinerg acetilkolin receptor
CHST2	Szénhidrát szulfotranszferáz
CHUK	Konzervált hélix-hurok-hélix szerkezettel rendelkező ubiquitin kináz, az I κ B kináz komplex része
CIITA	Az MHC II molekulák transzaktivátora
CIL	A ciliumban elhelyezkedő fehérjék (pl. CIL-7)
CLEC2B	A C-típusú lektin domént tartalmazó fehérjék családjának 2B tagja
CNR	Kannabinoid receptor (pl. CNR2)
CPLX	A szinaptikus vezikulák exocitózisában szerepet játszó complexin fehérjék
CREB	A cAMP reszponzív elemhez kötődő fehérjék
CTSS	A lizoszomális cisztein proteáz cathepsin S
CXCL	Egy CXC (két közeli cisztein) motívumot tartalmazó kemokin ligand (pl. CXCL2)
CYP	A citokróm P450 komplex tagjai (pl. CYP1A1)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol, fluoreszcens festék
DAB2IP	A Disabled homolog 2 fehérjéhez kötődő kis G fehérje
DMBX	Diencephalon/mesencephalon homeobox fehérje

DNM1L	A dynamin 1 fehérjére hasonlító, a mitokondriumok hasadását szabályozó fehérje
DNS	Dezoxiribonukleinsav
dNTP	Dezoxinukleotidtrifoszfát
DOLPP	Dolichyldifoszfátáz
DYNLL1	Dynein könnyű lánc
EGR	Korai növekedési válasz fehérje
ELISA	Enzimmötött immunoszorbens teszt
EML	A tüskésbőrűek mikrotubulusához kapcsolódó fehérjékre hasonlító fehérje
ENO	Enoláz
ERBB	Az epidermális növekedési faktor tirozinkináz receptorai (pl. ERBB4)
ERK	Extracelluláris jelek által vezérelt kinázok
ESCRT	A transzporthoz szükséges endoszómális osztályozó komplexek
ETS	Az E26 vírussal történő transzformációra specifikus transzkripció faktorok
EV	Extracelluláris vezikula
Evi	Evenness interrupted
FAS	Az apoptózis folyamatában fontos, a magzati alkohol szindróma kapcsán megismert receptor
FCAR	Fcα receptor, az IgA osztályú immunglobulinok receptora.
FDR	Téves felfedezési ráta (False Detection Rate)
FGF	Fibroblaszt növekedési faktor
FGFR	Fibroblaszt növekedési faktor receptor
FJX	Négyízű (four-jointed) morfogén
FOS	A Finkel-Biskis-Jenkins oszteosarkóma vírus által kódolt onkogén emberi megfelelője.
GAMT	Guanidinoacetát-N-metiltranszferáz
Gex	Génexpressziós ráta
GFPT2	Glutamin-fruktóz-6-foszfát transzamináz

GHRL	Ghrelin és obestatin prepropeptid
GO	Gén ontológia
GOLPH3L	A Golgi foszfoprotein 3-ra hasonlító fehérje
GPI	Glikofoszfatidilinoztiol
GPR	GPR68 és GPR 84
GSEA	Génhalmazok dúsulásának vizsgálata (Gene Set Enrichment Analysis)
GSEA-EM	A GSEA módszer eredményének grafikus ábrázolására szolgáló dúsulási térkép (Enrichment Map)
GTP	Guanozin-monofoszfát
HBEGF	Heparinhoz kötődő, EGF-szerű növekedési faktor
HDHC	A foszfohidrolázokra jellemző HD domént tartalmazó fehérje
HIF1 α	Hipoxia által indukált faktor
HILS	A spermatidákra jellemző linker hiszton
HIVEP	A humán immundeficiencia vírus enhancer régiójához kötődő transzkripciós faktor
HLA	Humán leukocita antigén (pl. HLA-DPA1 és HLA-DPB2)
HPRT	Hypoxantin-guanin foszforiboziltranszferáz
ICAM	Intercelluláris adhézións molekula
IFIH	Interferon által indukált, helikáz C domént tartalmazó fehérje
IFN	Interferon
IFT	Intraflagelláris transzport fehérje
IGLL	Immunglobulin lambda-szerű polipeptid
IKBKB	Az NF κ B inhibitor kinázának béta alegysége
IKBKG	Az NF κ B inhibitor kinázának gamma alegysége, más néven esszenciális regulátor vagy NEMO kináz
IL	Interleukin (pl. Interleukin 2)
IL17RA	Interleukin 17 receptor A
IL4I1	Interleukin 4 által indukált fehérje
ITCH	Egy E3 ubikvitin ligáz aktivitással rendelkező homológja a <i>Drosophila</i> Itchy fehérjének
JAK	Janus kináz

JUN	A madár szarkóma vírus 17 transzformáló genjével homológ gén által kódolt fehérje, transzkripció faktor alegység
JUNB	A JUN-B transzkripció faktort kódoló gén
KCNAB1	Feszültségkapuzott káliumcsatorna béta 1 alegysége
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KLF	Kruppel-szerű faktor
L3MBTL	Letális-3-malignus agydaganatból izolált fehérjéhez hasonló
LMP1	Az Epstein-Barr vírus látens membránfehérjeje
LTA	Limfotoxin A
LYSMD	LysM (lizin motívum) domént tartalmazó fehérje
MAPK	Mitogén-aktivált fehérjekináz
MDP	Magnéziumfüggő foszfatáz
METTL	Metiltranszferáz-szerű
MFAP	Mikrofibrillumokhoz kapcsolódó fehérje
MFSD	Major Facilitátor (Major Facilitator) szupercsalád domént tartalmazó fehérje
MHC	Major Hisztokompatibilitási Komplex
miRNS	Mikro-RNS
MLKL	Kevert sejtvonal kináz domén-szerű fehérje
MMP	Mátrix metalloproteináz
MNAT1	A ciklin-függő kináz összeállításáért felelős faktor, más néven MAT (menage a trois) génje
mRNS	Hírvivő (messenger) RNS
MSigDB	Molekuláris mintázatok adatbázisa
MT1B	Metallothionein 1B
MV	Mikrovezikula
MYC	A myelomacytosis Virális onkogénhez hasonló fehérje
MYCBP	A myc protoonkogénhez kötődő fehérje
MYO3B	Myosin IIIa fehérje
NEIL1	Endonukleáz VIII-szerű fehérje
NetID	Hálózati azonosító
NFE2L3	Nukleáris faktorhoz (erythroid 2) hasonló 3-as faktor

NFKB	Nukleáris faktor κ B (NF κ B)
NFKBI	Az NF κ B transzkripció faktor inhibitora
NKAPP	NF κ B aktiváló fehérje pszeudogénje
NKX	NK2 homeobox fehérje, más néven thyroid transzkripció faktor
NLRP	NACHT (apopotózist gátló), LRR (Leucingazdag ismétlődés) és PYD (pyrin) doméneket tartalmazó fehérjét (NALP) kódoló gén; a NALP3 közismert neve cryopiron, mely az inflammaszóma része
NOD	Nukleotid-kötő oligomerizációs domént tartalmazó fehérje
NPC1	A C1 típusú Niemann-pick betegségben szerepet játszó fehérje
NPM	Nucleophosmin
NR2F2	Magi receptort kötő faktor
NSFL	N-etil-maleimid érzékeny faktorhoz hasonló fehérje
OMV	Bakteriális külső membrán vezikula (Outer Membrane Vesicle)
P2X	X típusú purinerg receptor
P2Y	Y típusú purinerg receptor
PAK	A p21 által aktivált kináz
PANTHER	Fehérje analízis evolúciós kapcsolatok segítségével
PCR	Polimeráz láncreakció
PCSK	Subtilisin/kexin típusú proprotein konvertáz
PDB	Fehérje adatbank
PGAM	Mitokondriális szerint/treonin fehérje foszfatáz
PHB	Prohibitin
PLA	Foszfolipáz A
POLD	A DNS polimeráz delta alegysége
PPP1R	Fehérje foszfatázt gátló alegységek
PTGER	Prosztaglandin E receptor
PTX3	Pentraxin-szerű fehérje
PYROXD2	Piridin nukleotid diszulfid oxidoreduktáz
qRT-PCR	Valósídejű, kvantitatív polimeráz láncreakció
Rab	A Ras fehérjecsaldag agyi tagja.

Ral	Rashoz hasonló fehérje
Ras	Patkány szarkóma vírustól nyert fehérjéhez hasonló kis G fehérje
RBKS	Ribokináz
RBM	RNS motívumhoz kötődő fehérje
RBMS	RNS motívumhoz kötődő, az egyszálú láncsal interakcióba lépő fehérje
RDM	RAD52 (a DNS kettős lánc törés hibajavításában résztvevő egyik enzimre jellemző) motívumot tartalmazó fehérje
RELB	Reticuloendotheliosis onkogén B, az NFκB transzkripció faktor komplex része
REPS2	Ral-kötő fehérjéhez kapcsolódó, Eps (epidermális növekedési faktor receptor szubsztát) domént tartalmazó fehérje
RGS1	G fehérjék jelátvitelét szabályozó fehérje
RIPK1	Receptorral kölcsönhatásba lépő szerin/treonin kináz
RNS	Ribonukleinsav
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RPS26	Riboszómális S26 fehérje
RUVBL	A <i>Borrelia burgdorferi</i> azon génjéhez hasonló gén, amely az <i>Escherichia coli</i> baktériumot érzékennyé teszi UV fényre és mitomycinre
S1PR	Sfingozin-1-foszfát receptor
SCD	Sztearoil-koenzim A deszaturáz
SCG	Szekretogranin
SGK	Szérum és glukokortikoid által szabályozott szerin/treonin kináz
SLAMF	A SLAM (Signalling Lymphocyte Activating Molecule) fehérjecsald tagja
SLC40A1	Oldott anyagokat szállító membránfehérjék (solute carrier) családjába tartozó fehérje, más neve ferroportin
SMPD	Szfingomielin foszfodiészteráz
SREBF	Szterol regulatorikus elemhez kötődő faktor
SRGN	Serglycin

STAT	Jelátvivő és Transzkripció aktiváló (Signal Transducer and Activator of Transcription)
STX	Syntaxin
SWT	Szintetikusan letális a TREX (a DNS 3' vége felől haladó exonukleáz) fehérjével
SYT	Synaptotagmin
TAB	TGF BETA által aktivált kináz és a MAPK komplexhez kötődő fehérje
TBXAS	Thromboxán A szintetáz
TCR	T-sejt receptor
THG1L	Hisztidil-tRNS guanililtranszferáz
TMEM54	Az 54-es számú transzmembrán fehérje, másnéven béta kazein-szerű fehérje
TNF	Tumor nekrosis faktor
TNFAIP	A TNF által indukált fehérje
TNFRSF1A	TNF receptor szupercsalád 1A tagja, másnéven TNF receptor 1
TNFRSF1B	TNF receptor szupercsalád 1B tagja, másnéven TNF receptor 2
TOR	Torsin fehérjecsald
TRADD	A TNF receptor 1-es típusához kötődő, haláldomént tartalmazó fehérje
TRAF	A TNF receptorhoz kötődő faktor
TRRUST	Transzkripciós szabályozási kapcsolatok, melyekre a mondatlapú szövegbányászat hívta fel a figyelmet
TSG101	Daganatra hajlamosító gén 101
T-SNARE	Oldott állapotú N-metilmaleimid kötődéséért felelős fehérje receptor célpontja
UBE2D4	Az E2D4 jelű ubikvitin-konjugáló enzim
UBXN	Ubx (az ubikvitinációt szabályozó fehérjékre jellemző) domént tartalmazó fehérje
UPB	Béta-ureido propionáz
VPS	Vakuoláris fehérjeosztályozáshoz kötődő fehérje

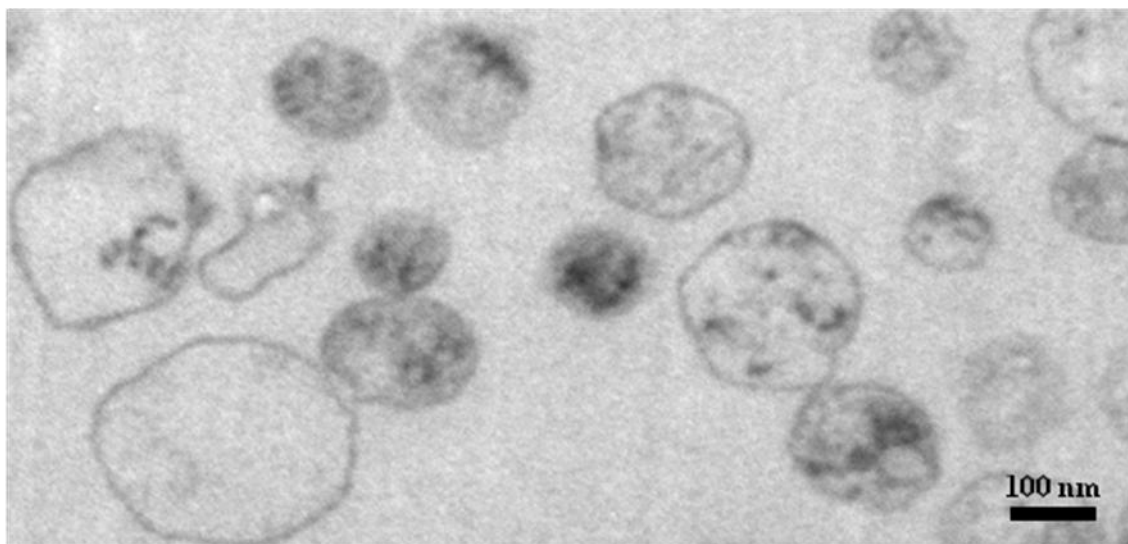
VTI	Vezikula transzport a T-SNARE fehérjékkel való kölcsönhatás segítségével, illetve az ebben részt vevő fehérjék
WDR	WD (triptofán-aszpartát) ismétlődéseket tartalmazó fehérje
WFIKKN	WAP (tejsavó savas fehérje), kazal, immunglobulin, kunitz és NTR (netrin-szerű) doméneket tartalmazó fehérje
Wnt	Szárnynélküliséggel kapcsolatos integrációs hely (Wingless-related integration site)
XK	A Kell vércsoportantigénhez kötődő transzmembrán fehérje
XRCC	Röntgensugárzás által okozott DNS sérülés hibajavítása során keresztkiegészítő fehérje, másnéven Ku autantigén
ZC3HAV	Cinkujjas CCCH típusú antivirális fehérje
ZFHX3	Cinkujjas homeobox morfogén
ZFYVE	FYVE (négy ciszteingazdag fehérjére jellemző) domént tartalmazó cinkujjas fehérjék
ZMAT	Cinkujjas matrin-típusú fehérje
ZMIZ	MIZ (az MSX morfogénhez kapcsolódó fehérjére jellemző) domént tartalmazó cinkujjas fehérje

1 Bevezetés

1.1 Az extracelluláris vezikulák (EVk) alapvető jellemzői

1.1.1 Az EVk felépítése

Az EVk kettős lipidmembránnal körülvett struktúrák (1. ábra), melyeket mind prokarióta, mind eukarióta sejtek kibocsáthatnak az extracelluláris folyadékterekbe [1–6]. A határoló lipidmembrán eukarióta sejtek esetében hasonló a kibocsátó sejtek sejtmembránjához, azonban az egyes lipid összetevők aránya – és ezeknek a sejtmembránra egyébként jellemző, aszimmetrikus eloszlása a két réteg között – nem teljesen azonos [1, 4, 7–9].

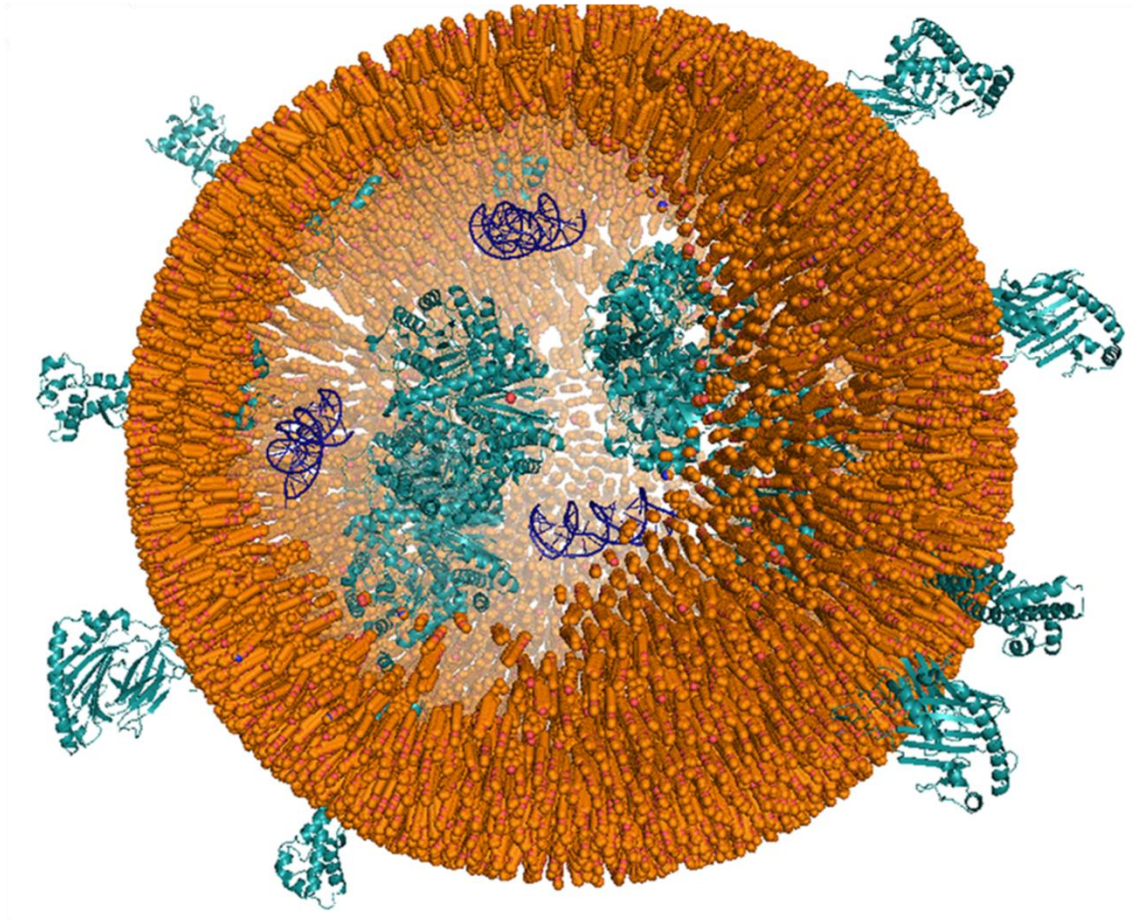


1. ábra: Elektronmikroszkópos felvétel extracelluláris vezikulákról [1].

Fontos különbség egyrészt, hogy az EVk jelentős részének felszínén foszfatidil-szerin is található [1–7, 10, 11], amely az intakt sejtek fosfolipid kettősrétegének csak a belső oldalán van jelen. Mivel azonban ennek a lipidnek a megjelenésére az EVk felszínén az EVk kimutatása során is gyakran támaszkodunk, nehéz megítélni, hogy ez a megfigyelés mennyire általános érvényű [12]. Az azonban igen valószínű, hogy a foszfatidilszerin kihelyeződése az EVk felszínére nem csak az apoptózis során keletkező sejt-fragmentumokra jellemző – ahogyan az már jóval az EVk leírása előtt is ismert volt –, hanem egy több más EV típusra is [1–7].

Az EVk membránját másrészt számos olyan lipid alkotja, amely a sejtmembránban csak jóval kisebb mennyiségben vagy csak egyes helyeken fordul elő.

Különösen érdekes megfigyelés, hogy – legalábbis egyes EV típusok membránjában – a koleszterin és a szfingolipidek a sejtmembrán lipid tutajaira emlékeztető módon jelennek meg [8–11, 13]. További párhuzam figyelhető meg a sejtmembrán egyes mikrodoménjei – mint például a lipidtutajok – és az EVk membránja között, ha a lipid kettősrétegbe merülő transzmembrán fehérjéket vizsgáljuk. Sokszorosan alátámasztott tény ugyanis, hogy az EVk felszínén a tetraspaninok (kiemelten a CD9, CD63 és a CD81) is jelen vannak [1–7, 14, 15], amelyek pedig a sejtmembrán tetraspaninban gazdag mikrodoménjeinek fontos alkotóelemei.



2. ábra: Egy 25 nm átmérőjű EV méretarányos modellje néhány felszíni CD63 és MHC molekulával, belsejében pedig két enolázzal és három miRNS molekulával [16]

A tetraspaninok mellett számos egyéb transzmembrán fehérjét (például sejt felszíni receptorokat és MHC komplexet), vagy a lipid kettősréteghez más módon (például GPI horgonnyal) kapcsolódó fehérjét is találunk az EVk felszínén [1–7, 11, 13,

17, 18]. Ezek jelentős része természetesen glikozilált formában van jelen [19], amely további fehérjék kötődését is lehetővé teszi az EVk felszínére – immár a felszíni fehérjék szénhidrát oldalláncain keresztül [20]. Az EVk belsejében is számos citoplazmatikus fehérje található [1–7, 11, 13, 17, 18], amelyek jelentőségével kapcsolatban – nehezebb hozzáférhetőségük miatt – ma még csak igen kevés információ áll rendelkezésünkre.

A kettős lipidmembrán által körülzárt térben a citoplazmatikus fehérjék mellett számos metabolitot (például szénhidrátokat, aminosavakat, alkoholokat, eikozanoidokat és szterán vázas vegyületeket) is sikerült kimutatni EV preparátumok vizsgálata során [1, 4, 21]. A legnagyobb érdeklődés az utóbbi években azonban az EVk belsejében található összetevők közül nem a fehérje, lipid vagy szénhidrát tulajdonságú összetevőket övezte, hanem a nukleinsavakat. Az EVk egyes típusaiban ugyanis RNS, sőt DNS molekulák is találhatóak [1–7, 22, 23], amelyek ráadásul az EVk révén más sejtekbe is átjuthatnak [22–30].

1.1.2 Az EVk típusai

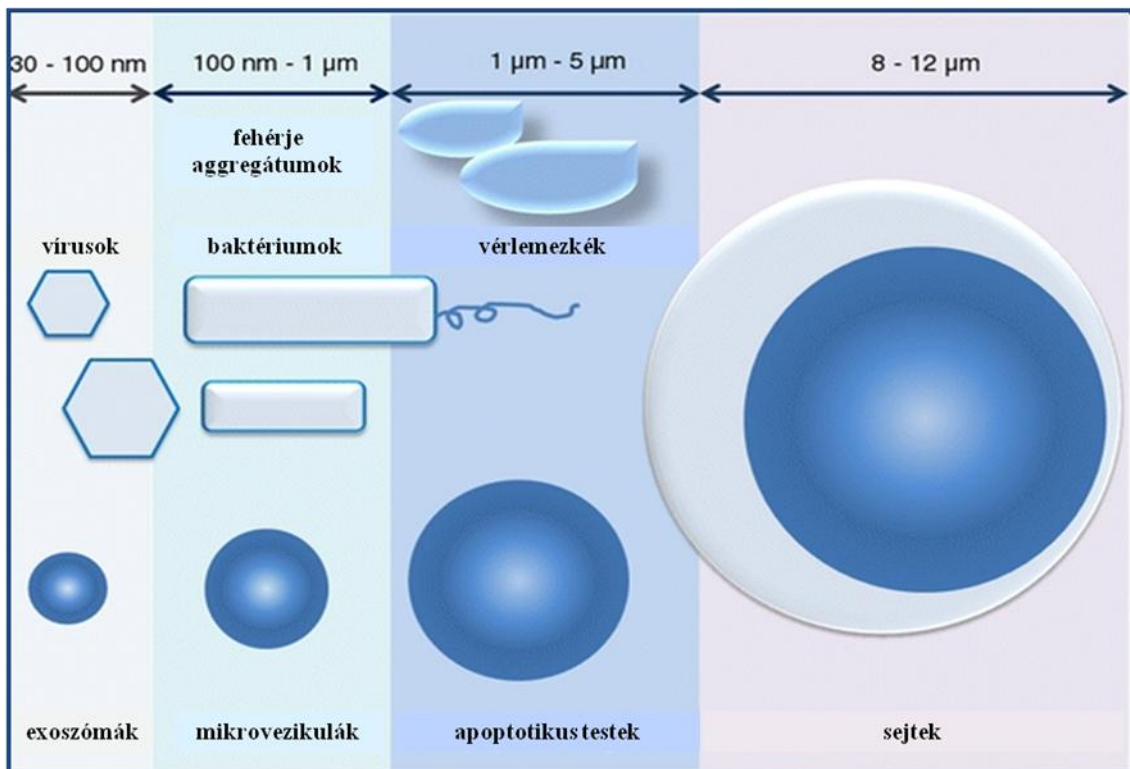
Habár az EVk szerkezete igen sok hasonlóságot mutat attól függetlenül, hogy milyen szövettani típushoz, mely fajhoz vagy akár birodalomhoz tartozott a kibocsátó sejt, mind összetételükben, mind méretükben, mind a keletkezés módja szerint rendkívül sokfélék lehetnek. A legfontosabb EV típusok közé sorolhatjuk a Gram-negatív baktériumok által kibocsátott külső membrán vezikulákat (OMVk), illetve az eukarióta sejtek által termelt exoszómákat, mikrovezikulákat (MVk), vagy más néven mikropartikulumokat/ektoszómákat/membránról leváló („shedding”) vezikulákat és az apoptotikus testeket [1, 2, 31, 32].

Az eukarióta sejtek által kibocsátott EVk három főbb típusa elsősorban méretük és keletkezésük mechanizmusa alapján különíthető el. Jelentős átfedés figyelhető meg ugyan az egyes típusok mérettartományában, általánosságban elmondható, hogy az exoszómák körülbelül 30-100 nm átmérőjűek és a multivezikuláris testek exocitózisa révén keletkeznek, míg a MVk (100-1000 nm) a plazmamembránról válnak le, az apoptotikus testek pedig – melyeket 1000 nm feletti átmérőjűek – az apoptózis során a sejtmembrán kitüremkedéseiből keletkeznek [1, 2, 4, 7, 31–34].

Többek között az igen jelentős méretbeli átfedéseknek is köszönhetően a szakirodalomban nem teljesen konzekvensen használják az elnevezéseket és különösen

az exoszómák és a MVk közötti különbségtétel nem mindig történik meg. Ma már egyre inkább elfogadott azonban az itt is felvázolt nomenklatúra, melynek használatát a tudományterület meghatározó tudományos testülete is kívánatosnak tartja [2, 35, 36].

Az extracelluláris folyadékterekben azonban számos egyéb, akár membránnal is körül vett struktúra található, amelyeket nem szoktunk az EVk közé sorolni. Ezek közül a struktúrák közül élettani körülmények között is jelen vannak a lipoproteinek, vérlemezkék, esetleg nagyobb fehérjekomplexek, míg patológiás állapotokban akár vírusok, baktériumok és immunkomplexek is megjelenhetnek. Ezek mérete hasonló lehet egyes EVk méretéhez (3. ábra), ami a kimutatásuk során komoly technikai kihívásokat támaszt [1, 35, 37, 38].



3. ábra: Az extracelluláris vezikulák jellemző mérettartománya az extracelluláris folyadékterekben előforduló egyéb struktúrák mérettartományával összevetve [1]

Ahogy az EVk tanulmányozása révén egyre több kísérleti eredmény halmozódik fel, az is világos, hogy az extracelluláris folyadékterekben találhatók további olyan struktúrák is, melyek tulajdonságaik alapján közel állnak az EVk valamely típusához, azonban a hivatalos nomenklatúra alapján még nem sorolhatók be biztonsággal (mint például onkoszómák, prosztaszómák és exoszóma-szerű vezikulák) [39–43]. Az egyes

EV típusok közötti, jelenlegi különbségtétel jogosultságát mégis alátámasztja, hogy mind az egyes típusok által hordozott nukleinsavak szintjén [44, 45], mind fehérjék szintjén [1, 18, 46–48] sikerült olyan különbségeket kimutatni, amelyek akár az egyes típusok eltérő funkciójára is utalhatnak.

Nem tagadható azonban az sem, hogy még az egyik legjobban tanulmányozott és legkonzekvensebben exoszómának nevezett EV típus sem teljesen egységes [49]. Hasonlóan markáns különbségek figyelhetők meg, ha ugyanazt az EV típust más-más sejttípus [1, 50–53], vagy ugyanazon sejttípus különböző hatásoknak kitett sejtjei [17, 34, 54–61] bocsátják ki. Élettani körülmények között a szevezetben keletkező EVk legkönnyebben a vérplazmából kiindulva vizsgálhatóak. Tovább komplikálja azonban az EVk kategorizálásának kérdését, hogy a vérplazmában kimutatható EVk aktuális számában és arányában is igen jelentős interindiviuális [62] és intraindividuális [63, 64] különbségek figyelhetők meg. Végül az egyes betegségekben [65–67] – különösen daganatos megbetegedésekben [68–76] – jelen lévő EVk egyedi, a betegségre jellemző összetevőjük alapján is felmerülhetne, hogy külön EV típusokként tekintsünk rájuk [39, 77].

1.1.3 Az EVk kibocsátásának mechanizmusa

Mivel sem az EVk egyes típusainak dinamikusan változó összetétele, sem az igen nagy átfedéseket mutató mérettartományok nem teszik lehetővé a konzisztens kategorizálást, az EVk felosztása elsősorban keletkezésük mechanizmusa alapján történik [1, 2]. Jelenleg azonban nem minden EV típus esetén ismertek részletekbe menően azok a molekuláris szintű események, melyek révén azok képződnek. A legtöbb ismerettel talán a legnagyobb méretű EVk, az apoptotikus testek keletkezéséhez vezető molekuláris lépésekről rendelkezünk. A tudományterület viszonylag nagy múltra tekint vissza, hiszen már az 1970-es években használták az apoptózis fogalmát [78], amikor az EVk létezésére még csak néhány szórványos megfigyelés utalt [1]. Ennek ellenére még az apoptózissal kapcsolatos ismereteink sem tekinthetők teljesnek [79–82].

Egyre jobban ismerjük azokat a jelzéseket, jelátviteli útvonalakat és enzim-kaskádokat, amelyek az apoptózishoz vezetnek. A folyamat végső fázisával, maguknak az apoptotikus testeknek a létrejöttével kapcsolatban azonban minden valószínűség szerint több fontos dolog is felfedezésre vár még. Ilyen érdekes adalék az apoptotikus testek keletkezésével kapcsolatban az a megfigyelés, miszerint az apoptózis során

hosszú gyöngyfűzészerű struktúrák fűződnek le a sejtekről, amelyek azután 1000 nm körüli átmérőjű képletekké töredeznek szét [83]. Ez a méret pontosan egybe vág a kisebb méretű apoptotikus testek mérettartományával. Az az adat ugyanakkor, amely szerint ezekből a kisebb apoptotikus testekből hiányzik a DNS, míg a nagyobb méretű apoptotikus testekben DNS fragmentumok is jelen vannak, felveti annak a lehetőségét, hogy az EVk egyes típusai (nemcsak az exoszómák, hanem az apoptotikus testek sem) nem tekinthetők egységesnek.

Jóval kevesebb ismerettel rendelkezünk arról a mechanizmusról, amelynek révén a MVk fűződnek le a sejtmembránról. Ebben a folyamatban minden bizonnyal kiemelt szerepet játszik az aktin sejtváz és a hozzá kapcsolódó fehérjék [1, 33, 84]. Jóllehet kis mennyiségben a nyugvó sejtekből is származhatnak MVk, bizonyos hatásokra rövid idő alatt igen nagy mennyiségű MV szabadulhat fel [1, 33, 85]. A folyamat sebességét jelezheti, hogy THP-1 monocita sejtvonal sejteinek stimulálása ATP segítségével a P2X7 receptoron keresztül 2-5 másodpercen belül MVk lefűződéséhez vezet [86].

Dendritikus sejteken található P2X7 receptor aktiválása szintén MVk kibocsátásához vezet [87], míg egy másik purinerg receptor típus (P2Y) aktiválásának következtében vérlemezkékből szabadulnak fel MVk [88]. A purinerg receptorok aktiválása jellemzően kalcium beáramlásához vezet [89–91] és az intracelluláris kalcium-koncentráció növekedése közvetlenül, vagy jelátviteli elemek foszforillációját előidézve vezet az MVk kibocsátásához [92]. A további lépésekről azonban csak szórványos információkkal rendelkezünk. Az aktin citoszkeleton szerepe mellett a PAK1/2 jelátviteli út [84] és az inflammaszóma aktiváció (különösen az ASC/NLRP3 komplex) jelentősége is ismert [93, 94], de ezek a teljes folyamatnak csak kiragadott elemei. A MVk képződésével kapcsolatos részletek jelentős részének felfedezése még várat magára.

Valamivel jobban ismertek az exoszómák keletkezésében fontos szerepet játszó molekuláris mechanizmusok. Ez részben annak is köszönhető, hogy a multivezikuláris testek – amelyeknek a belsejében „születnek” az exoszómák – már jóval az EVk felfedezése előtt ismertek voltak [95, 96], így tanulmányozásuk viszonylag hosszú múltra tekint vissza. Az exoszómák betüremkedését és lefűződését a multivezikuláris testekbe másrészt ugyanaz az ESCRT fehérjekomplex család segíti, amelynek az

endocitózisban, a citokinézisben és egyes vírusok kiszabadulásában van szerepe [97–101]. Az ESCRT rendszer mellett nagy valószínűséggel egyes tetraspaninok [14, 15, 100, 101] és a membránban megtalálható lipidek [99–101] is szerepet játszanak fontosak az exoszómák keletkezésében.

Az exoszómák belsejében szállított fehérjék egy része is az ESCRT rendszer segítségével kerül az endoszomális sejtszervecske-rendszer egyik fontos elosztópontjára, a multivezikuláris testekre. Ezek a fehérjék jellemzően ubikvitináltak és ezt a poszttranszlációs módosítást ismeri fel az ESCRT rendszer [98–103]. Az ESCRT rendszer elemei közül az egyik legfontosabb valószínűleg az ALIX, amely syndecan és syntenin fehérjékkel együttműködve olyan kulcsfontosságú fehérjék exoszómákra irányítását végzi, mint például a CD63 [104–107]. Ismert azonban, hogy más módon akár ubikvitinátlan fehérjék is beépülhetnek az exoszómákba, amiben a tetraspanin mikrodomének jelenléte vagy a fehérjék oligomerizációja segíthet [14, 15, 99, 103]. Végül nem csak egyes fehérjék kerülnek szelektíven az exoszómákba, hanem RNS molekulák is [103, 108, 109], amiben szintén fontos szerep juthat az ALIX-nak [110].

Miután a megfelelően célba juttatott fehérjékkel és RNS molekulákkal megrakottan az exoszómák a multivezikuláris testekbe lefűződtek, a multivezikulázis testeknek el kell jutniuk a sejtmembrán közelébe, majd azzal összeolvadva az exoszómákat az extracelluláris térbe bocsátani. Ezeket a folyamatokat segítik a Rab [111, 112] és Ral [113] GTPáz fehérjék. A multivezikuláris testek kiürülését eredményező jelátviteli útvonalakat szintén igen kevésbé ismerjük [99]. A MVk kibocsátásához hasonlóan az exoszómák esetében is felmerül a kalciumbeáramlás szerepe [114], de kináz kaszkádok (például a MAPK) [115], a p53 tumorsuppresszor [116] és CIL-7 fehérje [117] érintettségére utalóan is vannak szórványos adatok. Ezeknek a jelátviteli utaknak a pontos szerepe az exoszómák keletkezésében azonban még tisztázásra vár.

1.2 Az EVk tanulmányozása révén megszerzett ismereteink gyógyászati felhasználásának távlatai

1.2.1 Az EVk jellemzői, amelyek lehetővé teszik, hogy befolyásoljanak élettani folyamatokat

Az EVk keletkezését szabályozó mechanizmusokat tehát ma még nem egészen értjük, de az már a jelenlegi ismereteink alapján is vitathatatlan, hogy legalábbis bizonyos összetevőiket célzottan irányítja a sejt az EVk kezdeményeire, hogy később jól körülhatárolható hatásokra adott válaszként bocsássa ki őket az extracelluláris térbe az EVk „szállítmányaként”. Mindez már önmagában elegendő bizonyíték annak alátámasztására, hogy az EVk nem csupán zavaró, funkció nélküli sejttörmelékek, hanem a sejtekből való szekréció egyik útvonalát képviselik [33, 118].

Már az is fontos biológiai szerepe lenne az EVk kibocsátásán alapuló szekréciós mechanizmusnak, ha segítségével csak a feleslegessé vagy veszélyessé vált elemektől szabadulhatnának meg a sejtek. Ez állhat például a virális transzkripció faktor LMP-1 exoszómákra irányítása [119], vagy a mRNS éréséhez köthetően, a splicing során kivágott RNS darabok exoszomális jelenléte mögött [120]. Az EVk azonban olyan fehérjék szekréciójáért is felelősek, melyek egyáltalán nem feleslegesek, hanem éppen valamilyen cél elérése érdekében kell, hogy az extracelluláris térbe kerüljenek. Ilyen fehérje például az immunrendszer egyik fontos jelátvivője, az IL-1 β , amely szintén nem klasszikus szekréció révén, többek között EVk segítségével is szabadul fel [86, 94, 121].

Az EVk minden bizonnyal a szöveti faktornak, a véralvadás extrinsic útjának kiindulási elemének szekréciójában is kulcsszerepet játszanak [122–124]. Talán éppen a szöveti faktor jelenlétének köszönhető az is, hogy a vérlemezke eredetű EVk alvadásban betöltött szerepének leírásához köthető az EVk felfedezése is, hiszen elsőként 1967-ben számoltak be EVk jelenlétéről az emberi vérkeringésben [122]. Az akkor még csak „vérlemezke pornak” nevezett vérlemezke eredetű EVk véralvadásban betöltött szerepéről ma már egyre több ismerettel rendelkezünk [123].

Mai ismereteink alapján nem túlzás azt állítani, hogy az EVk segítségével a vérkeringésbe juttatott szöveti faktor és az EVk membránja által biztosított felszín együttesen felelős azért, hogy folyamatosan jelen legyen kismennyiségű aktív thrombin – és ennek révén aktivált protein C – a vérplazmában [125]. Ennek az egyensúlynak a megbomlása pedig daganatos vagy autoimmun betegségekben – ahol az EVk nagyobb

menyiségben vannak jelen a keringésben – ezeknek a betegségeknek a thrombotikus szövődményeire is magyarázattal szolgálhat [124, 126–130].

Messze túlmutat ugyanakkor az EVk jelentősége még a szabályozott, célzott szekréción is. Nemcsak EVk kibocsátásra képesek ugyanis a szervezet sejtjei, hanem azok felvételére is [131, 132]. Ezáltal pedig az EVk egy általános, komplex „információsomagok” küldését lehetővé tevő intercelluláris kommunikációs mechanizmusnak tekinthetők [3, 5, 133–139]. A virális LMP-1 példáján keresztül könnyű megérteni, hogy ha a vírusfertőzött sejtekből kikerül, és az LMP-1 fehérjét tartalmazó EVk bekerülnek más sejtekbe, akkor a molekula a recipiens sejtekre is hatással lehet. Valóban vannak kísérletes adatok arra vonatkozóan, hogy exoszómák segítségével a virális LMP-1 átkerülhet más nem fertőzött sejtekbe és ott is a sejtprolifерáció irányába tolja el az egyensúlyt [140, 141]. Külön érdekes azonban, hogy itt egész „információsomagról” van szó, hiszen a virális LMP-1-et tartalmazó EVk egy részében a HIF-1 α [141] és az ismert módon immunmoduláns hatású galektin-9 [142] is jelen van.

Az EVk belsejében nukleinsavakat is találunk, és az előzőekben említett „információsomagból” a nukleinsavak sem maradnak ki [140]. Általánosságban is elmondható, hogy a szakirodalomban igen sok utalást találunk az EVk belsejében található RNS molekulák szerepére az üzenetek közvetítésében [23, 27, 29, 71, 143, 144]. Mi több, egyesek szerint az RNS molekulákhoz hasonló jelentőségű lehet az elsősorban az apoptotikus testek belsejében fellelhető DNS is [22, 28]. A sejtek közötti kommunikációval kapcsolatban a legtöbb közlemény a kis RNS-ek (például miRNS-ek) és a mRNS molekulák szerepével foglalkozik, és itt számos konkrét kísérleti rendszerben sikerült is bizonyítani, hogy az EVk által szállított RNS-t a recipiens sejtek nemcsak felvették, hanem valóban hasznosították is saját folyamataik szabályozására; sőt, akár a mRNS-ről fehérjék átírására is [56, 27, 145–147, 25, 148, 149, 26].

Az EVk RNS molekuláinak tanulmányozásában rejlő lehetőségek mára némileg háttérbe is szorították az EVk felszínén és belsejében egyaránt megtalálható fehérjék iránti érdeklődést. Pedig a virális LMP-1 fehérje példáján kívül számos megfigyelés utal még arra, hogy ezeknek a fehérjéknek is fontos szerepe lehet az EVk által közvetített intercelluláris kommunikációban. A daganatokkal kapcsolatos szemléletünket alapjaiban változtatta meg például az a megfigyelés, miszerint daganatos sejtvonalak az

EVk közvetítésével képesek átadni mutáns EGFR növekedési faktor receptorukat a környező sejteknek (például hámsejteknek), minek következtében az ép genommal rendelkező sejtek is tumoros fenotípust nyernek [150, 151]. Élettani körülmények között is fontos lehet az EVk fehérjeszállító szerepe például sejtmembránba ékelődő csatornák mennyiségének szabályozásában, amint azt az aquaporin példája is mutatja a vesében [152].

Célkitűzéseink szempontjából különösen érdekesek azok az EVk által szállított fehérjék, amelyek az immunrendszer funkcióiban játszanak szerepet. A már említett IL-1 β mellett más citokinek, mint például az IL-8 is kimutatható az EVk egyes típusaiból [148]. Egy másik fontos citokin, a TNF pedig transzmembrán formában van jelen az EVk felszínén [163] a T-sejt aktiváció hatékonyságát növelve [153], vagy éppen a daganatos sejtek elpusztítását segítve [154]. Nem csak citokineket szállíthatnak az EVk, hanem MHC molekulák is lehetnek a felszínükön [1, 93, 155–159], amelynek a révén a kulcsfontosságú immunológiai folyamatot, az antigén prezentációt is befolyásolhatják [1, 156, 160–168]. Ráadásul az EVk nem csak a peptidet kötött MHC komplexek átjutását segíthetik más sejtekre [169], hanem egy sor más, az immunválasz szempontjából meghatározó sejtfelszíni fehérjét is [170].

1.2.2 Az EVk vizsgálatának diagnosztikai jelentősége

Mivel az EVk a sejtek közötti kommunikáció egyik fontos mechanizmusának tekinthetők, mely révén számos élettani folyamatot befolyásolhatnak, nem meglepő, hogy megszámlálhatatlanul sok kóros folyamat kapcsán írtak le valamilyen eltérést velük kapcsolatban [1, 171, 172]. Az EVk mennyiségében és összetételében jelentkező változások leírása egyes betegségekből segíthet jobban megérteni az adott betegség kialakulásának mechanizmusát. Még nagyobb motiváció azonban, hogy a leírt eltérések segítségével pontosabb diagnózist állíthatunk fel egyes betegségek korai szakaszában. Néhány konkrét betegség esetében igen közelinek tűnik az EVk összetételére alapozott diagnosztika.

Az EVk egyik legkorábbi ismert funkciójának, a véralvadás elősegítésének [122] kapcsán logikus felvetés, hogy az EVk kimutatását thromboticus események diagnosztikájához használják fel [173], ez azonban egyelőre még nem terjedt el széles körben. Sokszorosan alátámasztott az EVk szerepe a keringési rendszer betegségei közül az atherosclerosis [174–176], a szívinfarktus [176–178], a szívelégtelenség [179],

a pulmonális hipertenzió [180] és az agyi ischaemiás események [181] kialakulásában. Mégis, egyelőre csak korlátozott mértékben sikerült alátámasztani, hogy például a fehérvérsejt-eredetű EVk mennyisége képes-e megjósolni az érlemeszesedés kialakulásának kockázatát [182], az endotél sejtek által kibocsátott EVk mennyisége pedig a szívelégtelenség kimenetelét [179], a pulmonális hipertenzió súlyosságát [183] vagy az agyi sérülés kiterjedtségét [181].

A neurológiai kórképek közül nemcsak a cerebrovaszkuláris betegségek esetében merült fel az EVk szerepe a betegség kialakulásában, hanem például olyan neuroinflammatorikus betegségek esetében is, mint a sclerosis multiplex [184, 185] és az Alzheimer-kór [186, 187]. Az EVk szerepe az előbbi esetben nem annyira a diagnózis felállításakor merül fel, hanem a betegek klasszifikálásában és a terápiára adott válasz követésében lehet hasznos a jövőben [185]. Az utóbbi betegség kialakulásában kulcsszerepet játszó amiloidot [188] és tau fehérjét [66] egyaránt sikerült kimutatni az EVk valamely típusából. Ez egyelőre inkább a betegségben szerepet játszó folyamatok megértéséhez visz közelebb, mint egy általánosan használható szűrőmódszer megalkotásához [186, 187]. Egy további, a fehérjék konformációját érintő neurológiai megbetegedés-csoportban, a prionbetegségekben az EVk vizsgálata azért lehet indokolt, mert az EVk a betegség terjedésének eszközei lehetnek [67, 189].

Az EVk belsejében megbújva újabb és újabb sejteket megfertőző prionok viselkedése sokban hasonlít a vírusokéra – azzal a különbséggel, hogy saját felépítéséhez szükséges információt nem kódol. Érdekes módon nem csak patogén fehérjék, hanem hiányos vírusok – vagy legalábbis örökítőanyaguk részlete – és retrotranszpozonok is felfedezhetők az EVk belsejében [190]. Annak fényében, hogy az exoszómák keletkezése ráadásul ugyanahhoz az ESCRT fehérjekomplexhez kötődik, mint a retrovírusok sejtől való kijutása [191], és a sejtek általi felvétel mechanizmusában is megfigyelhetőek hasonlóságok [192, 193], nem meglepő, ha sok esetben az EVk vizsgálata összefonódik a virológiával [38].

Mind a vírusfertőzött sejtek [140, 194, 195], mind pedig a patogén baktérium [196], gomba [197, 198] és parazita [199, 200] fajok és az ezekkel fertőzött sejtek [201–203] esetében beszámoltak az immunrendszer működését, illetve a mikrokörnyezetet befolyásoló EVk kibocsátásáról [204–206]. A gazdaszervezet és a kórokozók közötti küzdelem jobb megértése mellett a fertőzés során jelenlévő EVk vizsgálatától a jövőben

sok értékes diagnosztikai információt is várunk. Ez valószínűsíthető többek között azon megfigyelés alapján, hogy a szepszis kimenetelét az endotél sejtek által kibocsátott EVk mennyisége nagy biztonsággal előre vetíti [207].

Az EVk immunmoduláló hatása nem csak fertőzések során nyilvánul meg. Minden valószínűség szerint számos immunológiai folyamatban, így az autoimmun betegségek kialakulásában is fontos szerep jut az EVk által továbbított információnak [42, 208–210] és nem véletlenül van jelen nagymennyiségű EV rheumatoid arthritises [211, 212], SLE-s [213], vasculitises [214] és polimyositises [215] betegek testfolyadékáiban. Az immunológiai folyamatok figyelemmel kísérésének egy másik speciális esete a szervátültetés utáni követés. A kilökődés megelőzéséhez a lehető legkorábban fel kell ismerni a veszélyt. Ennek egyik nem invazív módja lehet a jövőben, ha például veseátültetés után a vizelettel ürülő EVk összetételét – elsősorban RNS-tartalmát – monitorozzuk [216].

Egy allograft helyzetéhez több szempontból is hasonlít a szemiallograft magzat helyzete a terhesség során. Nem csoda, ha az élettani terhességhez köthető immunológiai változások létrejöttében, a magzattal szembeni tolerancia fenntartásában is felmerül az EVk szerepe [217–221]. A méhlepény mikrobolyhairól leváló EVk fontosságát legjobban az mutatja, hogy több megfigyelés alapján közülük lehet a preeclampsia kialakulásához [222, 223]. Elképzelhető ezen kívül, hogy a fogantatást megelőző történések szabályozásából is kiveszik a részüket az EVk, mégpedig az petefészek follikulusain belüli kommunikációt elősegítve [224].

A legnagyobb érdeklődés ma mégis a tumorok által kibocsátott EVk vizsgálatában rejlő diagnosztikai lehetőségeket övezi [225–228]. A tumor markerek új generációja sokkal nagyobb specificitást és szenzitivitást ígér az EVk által szállított RNS molekulák vizsgálata révén [225, 228] akár nem invazív módon vett mintákból [229]. Az előzőekben már említett, vizelet eredetű exoszómák például az egyik legkevésbé invazív módon vizsgálható mintát jelentik, melyek az urogenitális rendszer megbetegedéseinek pl. daganatainak diagnosztikáját forradalmasíthatják [230, 231]. A vizeletben található exoszómák segíthetnek például a prosztatatrák minél korábbi felismerésében [232–235]. Más tumorok (például tüdőrák [236], agytumorok [237, 237], vastagbélrák [238], emlőrák [70] vagy petefészekrák [239, 240]) esetében jobb eredmény érhető el a plazmában található EVk RNS-tartalmának elemzésével.

1.2.3 Az EVk, mint a terápia eszköze

Az EVk által szállított RNS molekulákkal kapcsolatos ismeretek nemcsak a biomarkerekről alkotott képünket formálhatják át, hanem egy egészen új terápiás eszközt is a kezünkbe adhatnak. Mivel ugyanis az EVk retrotranszpozonokat képesek szállítani [190] és sok hasonlóságot mutatnak a vírusokkal [191], logikusan felmerül annak a lehetősége, hogy az extracelluláris vezikulák génterápiás vektorokként is felhasználhatók [241, 242]. A terápiás DNS vagy RNS molekulákat elektroporációval (nagy valószínűséggel bizonyos mennyiségi és méretbeli korlátok között) sikerülhet az EVk belsejébe juttatni [243] és akár siRNS-t is el lehet juttatni a célsejtekhez EVk segítségével [24, 30]. Egy másik lehetőség, hogy magát a virális vektort – például az adeno-asszociált vírus partikulákat – „csomagoljuk” az EVk membránjához hasonló lipidrétegbe [244].

A nukleinsavak mellett más kémiai tulajdonságú anyagok célba juttatása is szóba jöhet EVk segítségével. Ezek lehetnek akár gyógyszer-molekulák, melyek így célzottabban fejthetik ki hatásukat [245–248], vagy akár az EVk által szállított fehérjék. Ez utóbbi, a nukleinsavak helyett fehérjékre koncentráló megközelítés leginkább a neurológiai betegségek terápiájában merült fel [249]. Ebben az esetben sem feltétlenül egyetlen, empirikusan megválasztott fehérje EVk belsejébe töltése vezet a legjobb eredményre, hanem olyan kombinációk, melyek nagy hasonlóságot mutatnak az őssejtek által kibocsátott EVk tartalmához.

Az őssejt-eredetű EVk felhasználásának lehetőségeit nem véletlenül övezi nagy lelkesedés: a sejt-alapú őssejt hoz köthető kudarcok után az általuk kibocsátott EVk hatása élesztette újjá a területhez fűzött reményeket [250–253]. Csak egy kiragadott példa őssejtek az által termelt EVk lehetséges hatására az, hogy a CD34+ őssejtek exoszómái képesek az angiogenezist elősegíteni, amely jótékony hatású lehet például anginás betegekben [254]. A traumás agysérülés egyik egér modelljében pedig az exoszómákon alapuló kezelés elősegítette a kognitív funkciók visszatérését [255].

Ahogy az őssejtek által kibocsátott EVk esetében RNS molekulák, több szabályozó fehérje és talán az EVk lipid összetevői is egyaránt szükségesek lehetnek a szöveti regeneráció elősegítéséhez, ugyanúgy az EVk segítségével történő antigénbemutató is több tényező együttes jelenlétét igényli [163]. Mivel a dendritikus sejtek által kibocsátott EVk egyik élettani funkciója is az antigének bemutatása és így az

immunválasz szabályozása, nagyon vonzó lehetőség, hogy az EVk módosítása révén az immunválaszt is befolyásolni próbáljuk teljesen új vakcinációs stratégiát kidolgozva [162, 256].

Amennyiben az EVk felszínén található MHC molekulákhoz a fertőző ágensekből [257–259] vagy daganatokból [260–263] származó peptideket kötünk, a hagyományosnál sokkal hatékonyabb vakcinák hozhatók létre. Igen reménykeltő volt például annak a kísérletnek az eredménye, melyben az ilyen módon előállított EVk segítségével egerekben hatékonyan vissza lehetett szorítani a daganatot [264]. A hatékony immunválaszt vakcinák mellett ugyanolyan jelentőségű az immuntolerancia kiváltása is, melyre például szervátültetés során lehet szükség. Egy ilyen kísérleti modellben – szintén egerekben – az éretlen dendritikus sejtek által kibocsátott EVk segítségével lehetett az átültetett szervvel szemben toleranciát kialakítani [265].

1.3 Az EVk klinikai felhasználását hátráltató ellentmondásos kísérleti adatok

1.3.1 A vizsgálati módszerek korlátai

Élettani jelentőségükre, valamint diagnosztikai paraméterként és terápiás eszközként való felhasználhatóságukra utaló beszámolók látszólag egyértelműen alátámasztják az EVk alkalmazásának létjogosultságát a mindennapi orvosi gyakorlatban [266]. Mégis, a tapasztalat azt mutatja, hogy az EVk hatását leíró kutatási eredmények egyelőre csak korlátozott mértékben és igen lassan épülnek be a klinikumba [267, 268]. Ennek hátterében igen szerteágazó okok állhatnak, de ezek között minden bizonnyal kiemelt szerepe van annak a szkepticizmusnak, amely a területet övezi. Az EVk létezését sokáig kétségbe vonták és a kis, membránnal határolt struktúrákat zavaró műterméknek, sejttörmeléknek tekintették [1, 33]. Annak ellenére, hogy ma már sokszorosán bizonyított tény az EVk létezése, élettani jelentőségük megítélése nagyon változó.

Valóban igen sok ellentmondás fedezhető fel azoknak a kísérleti eredményeknek az összevetése során, amelyek például egy-egy betegségben igyekeznek jellemezni az EVk tulajdonságait – felszíni markereit, eredetét, mennyiségét [36]. Ennek hátterében részben az EVk vizsgálatához rendelkezésre álló technikák korlátai is állnak. Nagyon sok esetben a vérkeringésben jelenlévő EVk jellemzését áramlási citométerrel végezték, melynek az optimális méréstartománya alatt marad az EVk többségének mérete [269].

Egy adott detektált jel akár több EV jelének egymásra rakódása – egy EV raj jele – is lehet [270], sőt a jelet képző események nem is feltétlenül a membránnal körülvett struktúrák, hanem – mint azt munkacsoportunk igazolta – akár nagyobb fehérjekomplexek is lehetnek [271].

Ma már léteznek azonban ajánlások arra vonatkozóan, hogy hogyan lehet megfelelő mintaelőkészítés [35, 36, 272–275], kalibrációk [276–278], hígítási sorok [270], festékek [279] vagy akár detergenstartalmú kontroll mérések [271] felhasználásával a hagyományos áramlási citometria eredményei alapján is megalapozott következtetéseket levonni az EVk tulajdonságaira vonatkozóan. A technológiai fejlődés révén azonban az áramlási citometriának is kezd kialakulni egy nagyobb érzékenységgű változata [63, 279–281], míg az EVk kimutatására egyre több új technológia áll rendelkezésre [282]. A teljesség igénye nélkül kiemelkedő lehetőségek rejlenek az EVk vizsgálatára optimalizált mikrofluidikai rendszerekben [283–286] és a nagy áteresztőképességű [287–293], illetve jelölésmentes detektálási módszerekben [294, 295], vagy akár az optikai csipesz kihasználásában [296]. Elsősorban a nagy áteresztőképességű rendszerekbe való integráció lehetősége miatt külön kiemelendő a felületi plazmon rezonancia felhasználása az EVk kimutatására [295, 297, 298].

Az EVk morfológiájáról képalkotó módszerekkel kaphatunk képet, melyek közül a krioelektronmikroszkópia [40, 299–301], az elektronmikroszkópos tomográfia [302] és az atomerőmikroszkópia [294, 303, 304] tartoznak a leginnovatívabb módszerek közé. A krioelektronmikroszkópiával elkerülhető például a fixálás következtében kialakuló zsugorodás, így ma már magabiztosan megállapíthatjuk azt is, hogy az EVk a keringésben milyen méretűek és hogy kicsi méretük nem műtermék csupán.

A méret és a mennyiség meghatározásához segítségül hívhatjuk a nanorészecskék mozgását elemző NTA módszert [305], vagy a Coulter-elv kiterjesztését a mikrométer alatti mérettartományra nanopórusok segítségével [306]. Az EVk által egy néhány nanométeres átmérőjű póruson való áthaladás közben létrehozott ellenállás-változás mérésén alapul a qNano készülék mérési elve [294, 306], melyet kísérleteink során mi is alkalmaztunk az EVk mennyiségének és mérettartományának meghatározásához. Ez a lépés alapvető fontosságú ahhoz, hogy az EVk hatását vizsgáló kísérletek összehasonlíthatóak legyenek [307–309]. Mindez talán megcáfolhatja azt a

vélekedést, miszerint a korábbi, közvetett mérések alapján számítva az egész szervezetben nincs annyi EV, mint egy tipikus *in vitro* kísérleti rendszerben [310], vagy hogy átlagosan nem jut egy RNS molekula egy EV belsejébe [311].

1.3.2 Az EV preparátumok heterogenitása

Hiába kapunk egyre megbízhatóbb eredményeket az EVk vizsgálatára szolgáló legújabb technológiák segítségével, az eredmények összehasonlíthatóságának az is feltétele lenne, hogy ugyanazokat az EV típusokat vizsgáljuk. Márpedig élettani körülmények között a szervezet extracelluláris folyadéktereiben a legkülönbözőbb EVk (például exoszómák, MVk és apoptotikus testek), egyszerre vannak jelen [1, 2]. Ugyanakkor a legtöbb kísérleti elrendezésben csupán egy adott típusú EV populáció vizsgálatát tűzik ki célul. Míg az áramlási citometriás mérésekhez nem kell feltétlenül megtisztítani és feldúsítani az EV tartalmú mintát, addig például a nukleinsavak kimutatásához igen [312–314], mely újabb nehezítő tényezőt jelent a későbbi összehasonlítások során [315].

Az egyik legelterjedtebb eljárás az EVk izolálására a nagysebességű centrifugálás adta lehetőségek kihasználása, de nincs olyan beállítás, amivel egyszerre az összes EV típus kinyerhető lenne [316–319]. Másrészt azt sem lehet kijelenteni, hogy egy adott protokoll optimális lenne egy adott EV típus izolálására, hiszen minden preparátumban több EV típus különböző arányú keveréke van jelen [316–319]. Különböző munkacsoportok ráadásul más-más centrifugát használnak, különböző geometriai jellemzőkkel, ami a rotor paraméterein keresztül szintén jelentősen befolyásolja az adott beállítások mellett izolált EVk összetételét [320, 321]. Ehhez járul még, hogy a centrifugálás során leülepednek más kolloid fázisban található struktúrák is, mint például a lipoproteinek [37] vagy fehérjekomplexek [271, 322]. Ez pedig azt eredményezi, hogy számos olyan fehérjéről gondoljuk, hogy az EVk felszínéhez kötődve vannak jelen az extracelluláris folyadékterekben, amelyek valójában azoktól teljesen függetlenül, más makromolekuláris struktúra részét képezik [323, 324].

Mivel az EVk igen ígéretes klinikai felhasználhatósága csak akkor kerülhet reális közelségbe, ha megbízható, jól reprodukálható és az egyes munkacsoportok között is összehasonlítható eredményekkel tudjuk alátámasztani az állításainkat [273]. Nagyon nagy a motiváció az EVk izolálásának standardizációjára [35, 36] és az EVk izolálásának sikerét befolyásoló tényezők feltárására [325]. Bár a legjobb minőségű EV

preparátumokat mai ismereteink alapján nagysebességű centrifugálás és sűrűséggrádiens centrifugálás kombinációjával lehet elérni [35, 36, 324, 326–331], a módszer munka- és időigényessége miatt az EVk izolálására egészen más megközelítések kiaknázása is felmerült. Ilyen új módszer lehet például a méretkizárásos kromatográfia különböző változatainak felhasználása [332–334], a kolloid fázis megtörése [335–337], mágneses gyöngyök alkalmazása [338] vagy mikrofluidikai rendszerekben az EVk akusztikai tulajdonságain alapuló elválasztás [339]. Ezeknek az új módszereknek kétségtelen előnye a gyorsaság és egyszerűség, ami elengedhetetlen feltétele annak, hogy egyszer a rutin klinikai gyakorlat része lehessen az EVk vizsgálata [273, 340, 341].

1.3.3 Az oldott állapotú jelátvivők hatásának figyelmen kívül hagyása

Az egyre innovatívabb megközelítéseknek hála, várhatóan sikerül majd kidolgozni olyan eljárást, amellyel megbízható és reprodukálható módon sikerülhet minden EV típust izolálni, vagy legalább olyan preparátumokat előállítani, amelyek csakis egyféle, a keletkezés mechanizmusa szerint élesen elkülönülő EV típust tartalmaznak, és más struktúrákkal nem szennyezettek. Ugyanakkor az ilyen, közel ideális EV preparátumok vizsgálata sem feltétlenül tükrözi megfelelően az EVk *in vivo*, szervezeten belüli hatását, mivel az izolált EVk rendszerint valamilyen semleges pufferben (PBS-ben vagy tenyésztőfolyadékban) kerülnek újra felfuszpendálásra. Ezzel pedig figyelmen kívül hagyjuk a ma már jó ismert, oldott állapotú hírvivő molekulák (például hormonok, vagy citokinek) szerepét ugyanabban a folyamatban, jóllehet az extracelluláris folyadékterekben EVk különböző típusai és oldott állapotú hírvivő molekulák egyszerre vannak jelen [1, 2].

Ismereteink nagyobb része olyan kísérleti rendszerből származik, ahol az EVk hatásának figyelembevételére nem nyílt mód. Ezért az oldott állapotú hírvivő molekulákkal kapcsolatos ismereteinket is érdemes lehet újra áttekinteni ennek a szempontnak a figyelembevétele mellett. Egyelőre ugyan nem áll rendelkezésre elegendő információ annak megítélésére, hogy az EVk jelenléte milyen mértékben képes befolyásolni az oldott állapotú hírvivők hatását, ám minden bizonnyal olyan tényezőről van szó, mely a különböző kísérleti rendszerek megfigyelései alapján levont következtetések során figyelembe veendő.

1.4 Oldott állapotú hírvivők és EVk közötti kölcsönhatás lehetősége

1.4.1 EVk lehetséges szerepe oldott állapotú hírvivők által meghatározott biológiai folyamatokban

A keringésben jelenlévő EVk felszíne és a vérplazmában oldott fehérjék közötti funkcionális kapcsolatra az egyik legrégebb óta ismert példa az EVk korábban már említett szerepe a véralvadás kezdeti lépéseiben [122, 124]. Az EVk nem csak a felszínükön található szöveti faktor révén segítik a véralvadást, hanem membránfelszínük és a membránjukban található foszfatidilszerin vázként is szolgál, hogy véralvadási kaszkád elemei egymáshoz megfelelő közelségben helyezkedjenek el [342, 343]. Az EVk által alkotott struktúra sokkal hatékonyabban segíti elő az alvadást, mintha a szöveti faktor és a foszfatidilszerin önmagában, oldott fázisban lett volna jelen [342].

Szintén jóval az EVk létezésének felfedezése előtt megismert, oldott állapotú hírvivő molekulák a neurotranszmitterek, amelyekkel kapcsolatban ismereteink nagy része olyan kísérleti rendszerekből származik, ahol fel sem merült a lehetősége, hogy az EVk befolyásolhatják hatásukat. Pedig ma már egyre világosabb, hogy az idegsejtekből is felszabadulnak EVk [344, 345]. Mi több, ennek dinamikája a neuronok glutamáterg szinaptikus jelátvitelének függvénye [346] és a kibocsátott EVk specifikusan kötődnek más neuronokhoz, míg a glia sejtekhez nem [347]. Az EVk ilyen módon RNS molekulákat vagy fehérjéket szállíthatnak más neuronokhoz, melyek hosszabb távon fogják befolyásolni a fenti sejtek aktivitását – ezzel együtt a neurotranszmitterek termelését – és hozzájárulhatnak az idegrendszer plaszticitásához [344].

Külön érdekes megfigyelés, hogy akár a szinapszisok területéről is felszabadulhatnak EVk – például a preszinaptikus membrán területéről az evenness interrupted (Evi) fehérje segítségével Wnt morfogén glikoproteint szállító exoszómák a preszinaptikus membrán területéről [348–351]. Hogy ez a mechanizmus milyen szerepet játszik az idegrendszer fejlődésében, még nem tudjuk egészen biztosan [351]. Felvetődött azonban, hogy az exoszómák nemcsak a szinapszisok kialakulását, hanem azok szabályozott megszüntetését is elősegíthetik [352].

Szinapszisok nemcsak az idegrendszerben vannak, hanem az immunrendszerben is: az antigénfelismerő sejtek (elsősorban T-sejtek, de akár B-sejtek vagy NK sejtek) és az antigénbemutató sejtek (dendritikus sejtek, makrofágok, B-sejtek) között kialakuló

szoros fizikai kapcsolatot is így nevezzük [353–357]. A klasszikus, T-sejtes immunológiai szinapszis lényegi eleme, hogy egy MHC-peptid epitóp komplex és az azt specifikusan felismerő TCR melyek révén a szinapszist alkotó két sejt membránja megfelelő közelségbe kerül egymáshoz. Ez a tényező lehetővé teszi, hogy a sejtaktiváció eredményeként a szinapszis területén felszabaduló citokinek nagy lokális koncentrációban, parakrin módon hathassanak [355]. Az antigént felismerő sejtek aktivációjában – és ezzel közvetett módon az oldott állapotú hírvivő citokinek kibocsátásában – pedig kulcsszerepe van a TCR és a szinapszisban a közelében elhelyezkedő egyéb kostimulációs faktorok (például CD28) által elindított intracelluláris jelátviteli folyamatoknak [355, 358].

A TCR aktivitás dinamikájának vizsgálata egy, az EVk lehetséges moduláló hatása szempontjából egészen érdekes részletre hívja fel a figyelmet. Jóllehet az immunológiai szinapszis körkörös struktúrája alapján logikus lenne, hogy a legfontosabb események a középső régióban történnek, ennek látszólag ellentmond az a megfigyelés, hogy az antigénfelismerő receptorokról elinduló jelátvitel megelőzi a szinapszis kialakulását [354, 356, 359, 360]. Mi több, a struktúra közepére helyeződő receptorokról már nem is indul valódi jelátvitel a sejt belseje felé – az a szinapszis periferiájára jellemző –, hanem a TCR multimerjei EVk felszínére kerülve hagyják el a sejtet [361]. Egészen nyilvánvalóan megakadályozza ez a jelenség a túlzott sejtaktivációt a receptorok számának csökkentése révén. Az EVk kibocsátásával pedig ugyanez a jelenség talán egy kifelé, más sejtek felé irányuló jelátviteli mechanizmust is képviselhet [362] – ugyanúgy, ahogy azt a B-sejtek specifikus antigénnel történő aktiválása után kibocsátott EVk esetében már leírták [363].

1.4.2 Az EVk jelentősége az antigének bemutatásában

Az EVk szerepe nem korlátozódik kizárólag a felesleges mennyiségű TCR multimerok eltávolítására az immunológiai szinapszis közepéről. Amint azt már korábban is említettük, a TCR partnermolekulájának tekinthető peptid-MHC komplex is megtalálható antigént prezentáló sejtekből származó EVk felszínén [155, 156, 159, 166, 364, 365]. Az MHC komplexek EVk felszínére irányításában nagy valószínűséggel az EVk fontos jellemzőjének tartott – és az immunológiai szinapszis más elemeinek megfelelő helyre irányítását segítő – tetraspanin molekulák (például a CD63) is szerepet játszanak [366, 367]. Az EVk felszínén található peptid-MHC komplexekben pedig

hatalmas lehetőségek rejlenek, hiszen nemcsak fertőző ágensekkel, hanem tumorokkal szemben is ígéretes vakcinációs eljárások alapulhatnak ezen a jelenségen [257–264, 368, 369].

Logikus feltételezés az EVk felhasználásával létrehozott vakcinák hatásmechanizmusával kapcsolatban, hogy egy peptid-MHC komplexet hordozó membránstruktúra hasonlít egy antigénbemutató sejt membránjára. Ezt részben alá is támasztják azok a megfigyelések, melyek szerint egy adott epitóp peptidet hordozó EVk nagy mennyiségben képesek az antigént bemutató sejtet helyettesíteni és a T-sejteket aktiválni [164–168, 370, 371]. Élettani körülmények között azonban kicsi a valószínűsége, hogy az EVk olyan nagy mennyiségben legyenek jelen egy T-sejt közelében, hogy valóban a sejtmentes antigénprezentáció legyen az MHC molekulákat hordozó EVk elsődleges funkciója [372, 373]. Az MHC molekulák mellett ráadásul kostimulációs faktorokra is szükség van a T-sejtek teljes értékű aktivációjához, amelyeknek a jelenlétéről EVk felszínén eddig csak kevesen számoltak be [167, 373].

A mennyiségi problémát át lehet hidalni többek között a lokális koncentráció növelésével. Ilyen megoldás például az EVk latex gyöngyök felszínére való rögzítése, de még hatékonyabb, ha az exoszómák eleve antigénbemutatóra képes sejtek felszínére kötődnek, ami egyszersmind a szükséges kostimulációs molekulákat is biztosíthatná [370, 372–375]. Ilyen antigénbemutató sejtek lehetnek például a dendritikus sejtek [376], amelyekkel kapcsolatban mára igen sok ismeret áll rendelkezésre [162]. A dendritikus sejtek felszínéhez kötődő EVk egyik lehetséges sorsa, hogy endocitózisa kerülve lebomlanak és így az antigénbemutató sejt immár a saját MHC molekulájához kötve ismét kihelyezheti a peptid epitópot a sejt felszínre [161, 374]. Még érdekesebb az EVk szempontjából, hogy nincs is feltétlenül szükség a peptidek újra feldolgozására, hanem az EVk felszínén már eleve jelenlévő MHC molekulák a recipiens sejt felszínén is maradhatnak [170, 377].

Az EVk endocitózisa egyrészt a sejten belüli raktározásukhoz is vezethet, mely lehetővé teszi, hogy később, a megfelelő sejtípussal való találkozás és az immunológiai szinapszis kialakulása során nagy lokális koncentrációban kerüljenek az EVk az antigént felismerő sejtek közelébe [378]. Figyelemreméltó, hogy talán a HIV vírus is éppen ezt a jelenséget használja ki a T-sejtek megfertőzésére annak kapcsán, hogy az antigénbemutató sejtek az EVkre hasonlító vírusokat tárolják, majd akkor zúdítják a T-

sejtekre, amikor azok szoros fizikai közelségbe kerülnek [378]. Bizonyos esetekben másrészt az EVk nem is kerülnek a sejt belsejébe, hanem vagy hosszabb ideig a sejtfelszínhez kötve maradnak, vagy beolvadnak a sejtmembránba és ennek révén „átruházzák” az MHC molekulákat és a rajtuk keresztül bemutatott peptid epitópokat a recipiens sejtre. Ez utóbbi jelenség a szakirodalomban „cross-dressing” néven ismert [169]. Ugyan az MHC molekulák átruházásnak csak az egyik lehetséges módja az EVk révén történő átvitel [169, 379, 380], ez a mechanizmus olyan kulcsfontosságú immunológiai folyamatokban is szerepet játszik, mint a T-sejtek szelekciója a csecsemőmirigyben [169, 381, 382].

Míg az antigént bemutató sejtek által kibocsátott EVk felszínén található MHC molekulák lehetséges szerepéről egyre többet tudunk, az EVk antigénbemutatásra gyakorolt egyéb lehetséges hatásairól, vagy az antigént felismerő sejtek által kibocsátott EVk által elindított folyamatokról csak töredékes információk állnak rendelkezésre. Pedig ha az MHC molekulával rendelkező EVk részben helyettesíthetik az antigént bemutató sejtet, akkor logikus, hogy például T-sejtek által kibocsátott EVk is képesek legyenek közvetlen sejtaktivációra [383]. Amit eddig sikerült megfigyelni, az inkább az exoszómákban található RNS molekulák – elsősorban pedig miRNS-ek – hatásával kapcsolatos: mind B-sejtek [363], mind pedig T-sejtek [384] képesek az antigénnel történő aktivációra adott válaszként EVk szabályozott kibocsátására. A T-sejtek által kibocsátott exoszómákról kimutatták továbbá, hogy a sejtaktiváció révén megváltozik RNS-összetételük, igazán hatékony kibocsátásuk az immunológiai szinapszishoz kötődik és itt az antigént bemutató partnersejtek fel is veszik őket [384]. Az exoszómákkal együtt felvett miRNS pedig nagy valószínűséggel szerepet játszik a recipiens sejtek válaszában finomhangolásában.

Ilyen finomhangolásra lehet példa az immunológiai szinapszisban, a T-sejtekből felszabaduló EVk szerepe lehetséges szerepe a B-sejtek aktivációjának szabályozásában. Egy elképzelés alapján ugyanis minél több, a T-sejtek által az immunológiai szinapszisba kibocsátott EV kötődik egy adott B-sejthez, annál több osztódásra lesz képes aktivációja után [385]. Ebben a folyamatban akár az EVk által szállított nukleinsavaknak, akár a fehérjéknek lehet jelentősége, azonban a pontos molekuláris szintű történések felmérése minden bizonnyal várat még magára. Annak a mechanizmusnak a részleteit valamivel jobban ismerjük, mely révén a CD8⁺ T-sejtek

EVk segítségével távolabb elhelyezkedő makrofágok citokinszekrécióját befolyásolhatják [386]. Ebben az esetben ráadásul az EVk nemcsak az immunológiai szinapszisban fejtik ki hatásukat, hanem nagy valószínűséggel valamivel távolabbi sejteken is.

1.4.3 Lehetséges kölcsönhatás a citokinek és az EVk között

A T-sejtek által kibocsátott EVk biológiai hatását azonban nem érdemes önmagában értékelni, hiszen azok oldott állapotú hírvivőkkel, citokinekkal együtt kerülnek az extracelluláris térbe [1, 2, 31, 387, 388], illetve annak jól körülhatárolt részére, mint például az immunológiai szinapszisba. Számos megfigyelés támasztja alá azt is, hogy maguk az EVk képesek kiváltani egyes citokinek felszabadulását [148, 220, 389–391] – sőt, az IL-1 β maga is EVk segítségével kerül ki az extracelluláris térbe [86, 94, 121]. Mégis, ezidáig igen kevés olyan tanulmány született, amely az EVk és valamely citokin együttes hatásának megfigyelésére összpontosított. Az egyetlen korábbi, ilyen megközelítéssel véghezvitt vizsgálat eredményei szerint a T-sejtek, melyek aktivált T-sejtek által kibocsátott EVk és IL-2 jelenlétében indultak osztódásnak, más citokineket termeltek a későbbiekben, mint csupán IL-2 jelenlétében [388].

Az IL-2 egy a T-sejtek által termelt és alapvetően autokrin módon ható faktor, mely az immunológiai szinapszis jól behatárolt terében fejt ki hatását, így a Wahlgren és munkatársai által vizsgált kísérleti rendszerben is ennek megfelelően választottak T-sejteket mind az EVk forrásául, mind pedig recipiens sejtként. Recipiens sejt azonban természetesen akár az antigént prezentáló partner sejt is lehetne, hiszen Mittelbrunn és munkatársai azt találták, hogy a T-sejtek az immunológiai szinapszison keresztül exoszómákba csomagolt szabályozó RNS molekulákat képesek partnerüknek átadni [384]. Ez olyan korai megfigyeléseket is új megvilágításba helyezhet (felvetve a citokinek mellett az EVk szerepét), mint az U937 monocita sejtvonalon megfigyelt változások T-sejtes sejtkultúra felülszója hatására [392]. Nemcsak a közvetlen közelben tartózkodó sejtekre hatnak továbbá az antigén felismerésének következtében termelt citokinek, hanem az immunológiai szinapszis területén kívül eső membránterületekről olyan citokinek (például IL-6 vagy TNF) is felszabadulnak, melyeknek jelentős távolhatása is van [355, 393].

A TNF kibocsátását ugyan jellemzően az antigént bemutató sejtekhez kötjük, és igen fontos a T-sejtekre kifejtett hatása [394–396], azonban régóta ismert a szerepe a

fordított irányú kommunikációban is. Erre példa az a megfigyelés, miszerint a TNF jelentősen módosítja monociták készségét arra, hogy antigéneket mutassanak be [397, 398] – akár autokrin módon hatva, akár a közelben éppen aktiválódó T-sejtekből az említett módon felszabadulva. Egészen más módon is befolyásolhatják továbbá a TNF fehérjecsaládba tartozó fehérjék az antigének bemutatásának sikerét kostimulációs funkciójuk révén [399–401]. Mivel az antigének bemutatását az EVk is több ponton befolyásolják [373], logikusan adódik a feltételezés, hogy a két szabályozási mechanizmus között létezik valamiféle kölcsönhatás.

Különösen érdekes az EVk és TNF hatása közötti kapcsolat vizsgálata annak fényében, hogy a TNF előfordulhat a sejtmembrán integráns részeként, EVk felszínén [153, 154] és oldott formában is [396, 402, 403]. A TNF hatása szempontjából ugyanakkor egyáltalán nem mindegy, hogy – mátrixmetalloproteinázok általi hasítás után – valóban oldott hírvivőként vagy membránhoz kötött formában van jelen, hiszen más jelátviteli útvonalak indulnak a kétféle ligandról [402, 404]. A TNF receptoráról kiinduló jelzések sejtszétváláshoz, a génátíródás megváltozásához, vagy akár apoptózishoz is vezethetnek [405]. Kevésbé ismert még, hogy milyen jelátviteli utakat befolyásol a sejtfelszíni TNF receptorként [402, 406]. A TNF receptorai megjelenhetnek továbbá az extracelluláris térben – akár EVk felszínén is [407, 408]. Ez a sejtfelszíni receptorokkal versengve egyrészt egy szabályozó mechanizmus lehet, másrészt viszont az IFN példájából kiindulva a citokin szállítását is elősegíthetik az EVk felszínéhez kötötten [409].

A direkt kölcsönhatásokon kívül feltételezhető az is, hogy a TNF kibocsátását – ahogyan más citokinekét is – szintén befolyásolja az EVk jelenléte. Ezt támasztja alá az a megfigyelés is, hogy T-sejtek által kibocsátott EVk jelenlétében megváltozott a vizsgált monocita sejtek által termelt TNF mennyisége [383]. Az egyes autoimmun betegségekben az anti-TNF biológiai terápiák kiemelkedő hatékonysága [410–413] ellenére alig találunk az említett példán kívül utalást arra, hogy az EVk jelenléte, vagy hiánya (például egy olyan jól bevált kísérleti rendszerben, ahol a rekombináns citokint pufferben oldva adták hozzá egy sejtvonalhoz) hogyan befolyásolja a TNF hatását.

Az extracelluláris térben élettani körülmények között egyaránt fellelhető citokinek és EVk hatása között tehát számos ponton kialakulhat kapcsolat. Indirekt bizonyítékok alapján úgy gondoljuk, hogy ilyen kölcsönhatást közvetíthet a kibocsátás

segítése, citokinkötés és szállítás a keringésben, versengés a sejtfelszíni receptorral, a citokinek jelátvitelét vagy termelődését befolyásoló sejtfelszíni receptorok aktiválása, vagy a transzláció szabályozása miRNS célsejtbe juttatása révén. Az elméleti lehetőségen túl azonban nagyon kevés kísérleti adattal rendelkezünk a pontos mechanizmusokról. Márpedig ha valóban képesek az EVk modulálni a citokinek hatását, az minden bizonnyal pontosíthatná a citokinekről, sőt közvetve az egész immunrendszer működéséről alkotott ismereteinket.

Különösen fontos lenne a már ma is sikeresen kiaknázott terápiás célpontok élettani szerepét minél pontosabban feltárni, hiszen ez járulhat hozzá ahhoz, hogy még hatékonyabbá, biztonságosabbá és akár személyre szabottá tudjuk tenni a terápiát. Ilyen terápiás célpont a TNF is, melynek kiiktatásán alapul az egyik leghatékonyabb kezelés bizonyos autoimmun betegségekben. Bár a mindennapi orvosi gyakorlat részévé váltak az ilyen módon ható szerek, a célba vett citokinekről alkotott ismereteink még ma sem teljeseek. A mozaik egy jelentős, de még hiányzó darabja lehet az EVk hatásának figyelembe vétele a citokinnel kapcsolatos eredmények értelmezésekor.

2 Célkitűzések

I. A CCRF humán T-sejtes sejtvonal kondicionált médiumában található EVk és citokinek jellemzése

Kísérleteink során az EVk donor-sejtvonalaként emberi CCRF T-sejtes sejtvonalat használtunk fel az EVk által kiváltott sejtélettani változások vizsgálatára. Jól ismert azonban, hogy az EVk biológiai hatásaival kapcsolatos kísérleti adatok igen ellentmondásosak [36]. Ennek okai igen összetettek, ám egy nagyon fontos tényező lehet az EVk heterogenitása, aminek következtében különböző eljárásokkal más-más típusú EVk dúsulnak fel a kísérletekhez felhasznált preparátumokban. Másrészt az EVk kinyerésére és „tisztítására” szolgáló eljárások között még ma is a nagysebességű centrifugálás a legelfogadottabb, amely viszont az EVk aggregációját okozva akár biológiai aktivitásukat is befolyásolhatja [414]. Az ilyen jellegű torzító hatások kiküszöbölésének érdekében adtuk közvetlenül a T-sejtes sejtkultúra felülszóját a célsejtekhez, amelyben feltételezésünk szerint az EVk változatos típusai teljes épségben megtalálhatóak voltak.

Rögtön felmerül azonban az a kérdés, hogy a sejtfelülszó centrifugálás nélküli felhasználása EVk forrásaként nem torzítja-e más műtermékek (például a sejtek felülszójába jelenlévő citokinek hatása) révén, de ugyanolyan mértékben az eredményeinket. Ennek kizárására a CCRF humán T-sejtek kondicionált sejtfelülszójának vizsgálata során a következő kérdéseket igyekeztünk tisztázni:

- a. Kimutathatók-e egyáltalán az EVk a CCRF sejtvonal kondicionált felülszójában – és ha igen, akkor ezek milyen felszíni antigének jelenlétével, milyen morfológiával és méreteloszlással jellemezhetőek?
- b. Ultracentrifugálással eltávolíthatók-e a sejtfelülszóban található EVk, hogy így EV-mentes médiumot kapjunk?
- c. A CCRF sejtek kondicionált médiumában vagy a kiülepített EVk preparátumában számítani kell-e a kísérleteinkben az oldott állapotú hírvivők modelljeként szolgáló citokin, a TNF jelenlétére?

II. A T-sejtek által kibocsátott EVk és a rekombináns TNF együttes jelenlétének monocita sejtek génátíródására gyakorolt hatásának vizsgálata

Az extracelluláris folyadékterekben együttesen előforduló oldott állapotú hírvivők és az EVk közötti kölcsönhatás vizsgálatához egy kulcsfontosságú citokin, a TNF szolgált számunkra az oldott állapotú hírvivők modelljeként. Az emberi CCRF T-sejtes sejtvonal által kibocsátott EVk jelenlétében bekövetkező génexpressziós változásokat pedig U937 monocita sejtvonal sejtjein figyeltük meg. A T-sejtek által kibocsátott EVk citokin-hatást módosító tulajdonságával kapcsolatban már rendelkezésre állnak kísérletes adatok [388]. Míg azonban a leírt kísérleti rendszerben az EVk autokrin szabályozásban vettek részt, az immunválasz szempontjából legalább ilyen jelentősége van a parakrin információáramlásnak.

A CCRF humán T-sejtes sejtvonal sejtfelülűsójában található EVk és a TNF hatására U937 humán monocita sejtvonal sejtjeiben bekövetkező génexpressziós változásokkal kapcsolatban az alábbi kérdéseket igyekeztünk megválaszolni:

- a.** A TNF, a T-sejtek által kibocsátott EVk, vagy a két tényező együttes jelenléte mellett mely gének kifejeződése változik meg egy monocita sejtvonal sejtjeiben?
- b.** A TNF és az EVk hatásának összevetése alapján hogyan csoportosíthatók a megváltozott átíródást mutató gének?
- c.** A génkifejeződés globális vizsgálata során megfigyelt legfontosabb változások reprodukálhatóak-e az egyedi gének vagy géntermékek szintjén?
- d.** A szakirodalomban ajánlott differenciálcentrifugálási lépések segítségével nyert EV preparátumok valamelyike képes-e reprodukálni a sejtfelülűszo jelenlétében megfigyelt legfontosabb változásokat?

III.A globális génexpressziós vizsgálat során megfigyelt változások biológiai jelentősége

A CCRF humán T-sejtes sejtvonal által kibocsátott EVk és a sejtfelülűszóban található EVk és a TNF jelenlétében megfigyelt génexpressziós változásokat igyekeztünk az egyedi gének szintjén túl a génekhez köthető biológiai funkció szempontjából is vizsgálni. Ezzel a megközelítéssel az alábbi kérdésekre vártunk választ:

- a. Az egyes kísérleti körülmények között szignifikáns mértékben megváltozott átíródást mutató gének milyen biológiai folyamatokban vesznek részt?
- b. A génkifejeződés globális mintázata mely biológiailag releváns génhalmazok tagjainak dúsulását mutatja?
- c. Egy, a génkifejeződés megváltozásának mintázata alapján relevánsnak tartott biológiai folyamatot, a kemotaxist hogyan befolyásolja a TNF, a MVk vagy a két tényező együttes jelenléte?

IV.A génkifejeződés megfigyelt változásaihoz köthető lehetséges effektormolekulák azonosítása

A TNF hatásának modulálása szempontjából igen érdekes az az irodalmi adat, miszerint az EVk felszínén TNF receptor is található és ennek révén a citokin szállításában is érintettek lehetnek [415]. Az EVk összetett struktúrájából következően azonban számos egyéb, membránfelszínhez kötött vagy a vezikulák lumenében található fehérje, nukleinsav vagy lipidmediátor is szerepet játszhat az általunk megfigyelt változásokban. Ennek megfelelően az EVk hatásmechanizmusának feltárásához az alábbi kérdések megválaszolásán keresztül igyekeztünk hozzájárulni:

- a. Az általunk vizsgált kísérleti rendszerben felvetődik-e a MVk felszínéhez esetlegesen kötődő TNF jelentősége?
- b. Milyen fehérjék jelenlétére kell számítani az EVk, illetve a MVk felszínén vagy belsejében?
- c. EVk – vagy kifejezetten MVk – által szállított fehérjék hatással lehetnek-e a TNF jelátvitelére?
- d. Az EVk vizsgálata során már leírt génregulatorikus elemek (pl. miRNS molekulák) felelőssé tehetők-e CCRF sejtvonal által termelt EVk hatásáért?

3 Anyagok és módszerek

3.1 A vizsgált sejtek és EVk

3.1.1 Sejtvonalak és fenntartásuk

A CCRF-CEM humán T sejtvonalat, valamint az U937 és a THP-1 humán monocita sejtvonalakat az ATCC-től szereztük be. A sejtkultúrákat RPMI tápfolyadékban (Sigma, Budapest) tenyésztettük, mely tápoldat 10% magzati borjúsavót (PAA, Budapest), 2mM glutamint, 100-100 U/mL penicilint és streptomycint, valamint 0,5 % ciprofloxacint (Fresenius Kabi, Budapest) tartalmazott 37 °C-on 5 % CO₂-ot tartalmazó légkör mellett. A sejtvonalak Mycoplasma-fertőzöttségét DAPI-festésen alapuló rendszeres ellenőrző vizsgálatok elvégzésével zártuk ki.

3.1.2 EV-tartalmú és EV-mentes felülúszó előállítása

Az EV donbor CCRF sejteket addig szaporítottuk, míg konfluens tenyészetet nem kaptunk. A kísérletek megkezdése előtt, miután a magzati borjúsavót tartalmazó, a sejtkultúra növekedéséhez szükséges médiumot eltávolítottuk és lemostuk, a sejteket szérummentes, 0,5% ciprofloxacint tartalmazó RPMI tápfolyadékban (Sigma, Budapest) szuszpendáltuk fel. Az ebben a környezetben, $0,5 \times 10^6$ sejt/mL-es kezdeti sejtsűrűség mellett 24 óra alatt keletkezett EVk kerültek a későbbiekben felhasználásra.

Az EV-tartalmú sejtfelülúszót 10 percig 300 g-vel centrifugáltuk, hogy a minden sejtet leüleptítsünk és a sejtmentes felülúszót használhassuk a továbbiakban. Az EV-mentes (kontroll) minta elkészítéséhez a 300g-vel 10 percen keresztüli centrifugálással sejtmentesített felülúszót tovább centrifugáltuk 20 500 g-vel 20 percig, hogy a nagyobb méretű (és az ultracentrifugálás szempontjából esetleg sérülékenyebb) EVk kiülepedjenek, majd az így kapott felülúszót még további 60 percig 100 000g ultracentrifugálásnak tettük ki, hogy a legkisebb méretű EVk is leülepedjenek. Az EV-mentes felülúszó előállításához az ultracentrifugálás után kapott felülúszót még egy 200 nm-es pórusátmérőjű szűrőn (Millipore, Budapest) is átszűrtük, hogy a centrifugálási lépések után esetlegesen megmaradt néhány EV is eltávolításra kerüljön. Mivel nagy nyomást alkalmazva a szűrő nagyobb vezikulákat „feldarabolhat” kisebbekre, és ezzel együtt EV törmelék kerülhetne a mintába, ezért szűrést mindig csak a már lecentrifugált minták felülúszóján alkalmaztunk és soha nem alkalmaztunk külső nyomást, hanem

megelégedtünk azzal, hogy a (maximum 10 cm magas) folyadékoszlop hidrosztatikai nyomása juttassa át a felülúszót a szűrőn.

3.1.3 U937 sejtek tenyésztése EVk, TNF vagy a két tényező együttes jelenlétében

Az előzőekben leírt módon nyert EV-tartalmú és EV-mentes kondicionált médiumot két-két részre osztottuk. A preparátumok egyik feléhez rekombináns TNF (Sigma, Budapest) citokint adtunk 10 ng/mL végkoncentrációban. Ilyen módon összesen négyféle különböző összetételű kondicionált médiumot kaptunk, melyeket U937 sejtekhez adtunk oly módon, hogy megközelítőleg 10^6 CCRF sejt által termelt EV-t tartalmazó kondicionált médiumban 5×10^6 U937 sejtet vettünk fel a törzstenyészetből. A kondicionált médiumok jelenlétében 6-lyukú szövetkultúrás lemezen 24 órán keresztül 37 °C-on, 5 % CO₂-tartalom mellett tenyésztettük az U937 sejteket, majd 300g-val 5 percig centrifugálva kiülepítettük őket és PBS-sel megmostuk az RNS-izolálás előtt. A sejtfelülúszót -80 °C-on tároltuk későbbi ELISA módszerrel történő citokinprofil elemzéshez. A kísérleteket négy, egymástól független ismétlésben végeztük el.

3.1.4 EV preparátumok előállítása

Az EV-preparátumok izolálásához két különböző differenciál-centrifugálási protokollt használtunk. Mindkét eljárás első lépései során 300g 10 perces centrifugálás segítségével kiülepítettük a sejteket a felülúszóból, majd a sejtes elemek lehető legteljesebb eltávolításának érdekében a lecentrifugált sejtfelülúszót még egy 5 µm-es pórusátmérőjű szűrőn is átszűrtük a szűrő feletti maximum 10 cm-es folyadékoszlop hidrosztatikai nyomása segítségével. Az így sejtmentesített, majd leszűrt felülúszót tovább ülepítettük 2000g-s centrifugálással 20 percen keresztül, hogy a néhány ezer nanométeres nagyságrendbe eső részecskék (mai tudásunk szerint elsősorban apoptotikus testek) is eltávolításra kerüljenek a mintából. Az így kapott felülúszót ismét leszűrtük az előzőleg leírt módon, de itt egy 800 nm-es pórusátmérőjű szűrővel. Az első eljárás során végezetül 12500g-val 10 percig centrifugáltuk az ismételt átszűrt felülúszót, amely így várhatóan elsősorban mikrovezikulákat (MVk) tartalmazott. Egy másik eljárás során a végső centrifugálási lépésben 20000g-t alkalmaztunk 40 percig, amely már alkalmas volt a MVk mellett a valamivel kisebb méretű EVk, az exoszómák kiülepítésére is.

Mindkét eljárás során a végső centrifugálási lépés során nyert üledéket az előzőleg már leírt módon elkészített EV-mentes, CCRF-eredetű kondicionált sejtfelülúszóban szuszpendáltuk fel, mielőtt az U937 sejtek sejttenyésztő folyadékához adtuk volna őket. Ennek, az EVk mikrovezikula csoportjával dúsított felülúszónak a hatását a teljes EV-tartalmú kondicionált médium (a CCRF sejtek ülepítése után 300g 10 perces centrifugálással, majd pedig 5 μ m pórusátmérőjű szűrés után), valamint a teljesen EV-mentes sejtfelülúszó hatásával vetettük össze.

A donor és recipiens sejtek arányát 5:1 körüli értéken igyekeztünk tartani, amennyiben hozzávetőlegesen 5×10^6 CCRF sejt által termelt MV vagy MV és exoszóma preparátumot adtunk 1×10^6 U937 sejthez. Az így kapott MV preparátumok átlagos fehérjetartalma alapján számítva, ezzel az eljárással a CCRF sejtek tenyésztőfolyadékának minden mL-je átlagosan 20 μ g fehérjét magában foglaló MV-preparátumot, vagy MVk és exoszómák 25 μ g-nyi keverékét tartalmazta. Az EVk közül legnagyobbbrészt MV frakciót tartalmazó (10 percig 12500g-vel centrifugált) preparátum hatásának vizsgálatokor 10 ng/mL végkoncentrációban TNF-et is adtunk egyes mintákhoz, hogy a tisztított EV frakciók és a TNF kombinált hatását is lemérhessük. Ebben a környezetben 24 órán keresztül 37 °C-on, 5 % CO₂-tartalmú légkör mellett tenyésztettük az U937 sejteket, mielőtt egy 300 g-s 5 perces centrifugálási lépés során leüleptítettük és megmostuk őket, hogy RNS-t izoláljunk a sejtes frakcióból.

3.1.5 TNF citokint csak a felszínükön hordozó MV preparátumok előállítása

Annak vizsgálatára, hogy a TNF és MVk együttes alkalmazása során az eltérő hatásért a MVk felszínére kötődő TNF lehet-e felelős, az izolált MVk preparátumát 10 ng/mL TNF-et tartalmazó RPMI tenyésztőfolyadékban szuszpendáltuk fel és ebben 30 percig tartottuk 37 °C-on. Az inkubációs idő leteltével a MVk leüleptítése egy 40 percig tartó 20000g-s centrifugálás (itt nem kellett attól tartani, hogy exoszómák is együtt ülepednek) segítségével történt. Ezt az üledéket ismét szérumentes RPMI tápfolyadékban vettük fel (a kiindulási térfogatnak megfelelő mennyiségű folyadékot hozzáadva) és ebben a környezetben 24 órán keresztül 37 °C-on, 5 % CO₂-tartalmú légkör mellett tenyésztettük az U937 sejteket. Kontrollként az előzőleg már leírt módon izolált MVk RPMI médiumban felvett preparátuma jelenlétében tenyésztett U937 sejtek szolgáltak, illetve a 10 ng/mL végkoncentrációjú TNF-et is ilyen módon előkészített mintákhoz adtuk hozzá, az előzőleg leírtakhoz hasonlóan.

3.2 Az EV preparátumok minőségellenőrzése

3.2.1 Áramlási citometria

A CCRF sejtek által termelt EVk felszínén található antigének kimutatásához egy FACSCalibur áramlási citométer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) volt segítségünkre segítségével. A műszer beállításait Megamix kalibrációs gyöngyök (BioCytex, Marseille) felhasználásával optimalizáltuk, ahogyan az a jelenleg elfogadott szakmai ajánlásokban és korábbi munkáinkban is szerepel [271, 272, 276]. A kalibrációs gyöngyök méretéből kiindulva helyeztük el a kiértékelés során azokat a kapukat, melyeken belül az EVk által létrehozott jeleket vártuk. Ezt a megközelítést egészítette ki a szilika kalibrációs gyöngyök (Kisker Biotech, Steinfurt) használata [416, 417]. A fikoeritrinnel (PE) jelölt, CD63 elleni antitestet és a fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) jelölt, CD9 elleni antitestet a Sigma-Aldrich-től rendeltük; a FITC jelölt Annexin V-öt, a szintén FITC jelöléssel ellátott CD5, CD71 és CD33 elleni antitesteket, valamint a PE jelöléssel ellátott CD33 elleni antitestet a BD Biosciences gyártotta.

A fluorokrómmal jelölt Annexin V, illetve a megfelelő antitestek kötődésére a megközelítőleg 5 mL kondicionált médiumnak megfelelő mennyiségű EV-t tartalmazó mintához 1 µl jelölőanyagot adtunk, majd szobahőmérsékleten, sötétben 20 percet állni hagytunk. A jelölt minták áramlási citometriás vizsgálata során közepes áramlási sebesség mellett 60 másodpercig számláltuk az előre meghatározott feltételeknek megfelelő események számát. A háttérzaj mértékének megállapításához azt a puffert is lemértük, amelyben a mintákat felfuszpendáltuk a festési eljárás során. Ez az Annexin V esetében 5 mM EDTA-t is tartalmazó Annexin-kötő puffer volt, míg az antitestek esetében PBS.

Annak megerősítésére, hogy az áramlási citometriás mérés eredményeként kapott jelek valóban vezikuláris struktúrákból (tehát EVk valamely frakciójából) származnak, es nem fehérje-aggregátumokból, a korábban közölt eredményeinkre támaszkodva a minták lemérése után 0,1%-os végkoncentrációban Triton X-100 hozzáadása után a mérést megismételtük [271]. Ez a lépés a fluoreszcens jelek jelentős részének eltűnéséhez vezetett, igazolván a jelek vezikuláris természetét. Az így kapott eseményszámot az első (detergens nélküli) mérés értékéből levonva, a felszíni antigént hordozó EVk számát kielégítő pontossággal meg tudtuk becsülni.

3.2.2 *Elektronmikroszkópia*

Ahhoz, hogy képet alkothassunk a kísérleteinkhez felhasznált EVk morfológiájáról, a kondicionált médiumokból vett reprezentatív mintákat további 60 percig ultracentrifugáltuk 100 000 g mellett. Az ultracentrifugálás után a felülúszókat leszívtuk és a kapott üledéket 4 %-os paraformaldehidet tartalmazó 0,01 M-os PBS-ben fixáltuk szobahőmérsékleten, 60 percig. A paraformaldehid oldatot a fixálás végeztével PBS-sel mostuk ki, majd a mintákat 1 %-os OsO₄ oldatban utófixáltuk 30 percig. Ezután a pelleteket fokozatosan emelkedő koncentrációjú alkohol oldatok sorozatában dehidratáltuk. A dehidratációs lépés részeként 50 %-os etanolban oldott 1 %-os uranil-acétáttal történt a minta kontrasztosítása 30 percig. Végül az üledékeket Taab 812 (Taab, Budapest) polimerbe ágyaztuk be, melyet 60 °C-on hagytunk megkötni. Az ultravékony metszetek elemzése Hitachi 7100 elektronmikroszkóp segítségével történt, amely Megaview II (Soft Imaging System) digitális kamerával volt felszerelve.

3.2.3 *Coulter-elv szerinti részecskeszámlálás*

Annak érdekében, hogy felmérhessük, milyen méretű EVk vannak jelen a kísérleteinkhez használt EV-tartalmú sejtfelülúszóban, valamint azt megerősítendő, hogy az EV-mentes felülúszó valóban nem tartalmaz vezikuláris struktúrákat, a kondicionált médiumot a qNano (IZON Science, New Zealand) készülékkel is vizsgáltuk [294, 418]. A részecskék számát három percen keresztül számoltuk 200 nm-es (NP200) és 400 nm-es (NP400) pórusátmérőjű nanopórus-membránok két oldala között létrehozott 10 vízcentiméteres nyomáskülönbség mellett. A membrán két oldalán lévő folyadékkamrák közötti potenciálkülönbséget 0,1 és 0,25 V közötti értékre állítottuk be, amivel stabil 100 nA körüli áramerősséget tudtuk elérni. A mérési eredmények a rendszer egyensúlyi állapotában kerültek rögzítésre, amikor a részecskék véletlenszerű mozgásából eredő átlagos zajintenzitás 12 pA alatti értéken stabilizálódott, a részecskék megközelítőleg egyenletes sebességgel haladtak át a póruson és nem tapasztaltunk a pórus eltömődésére utaló jelet.

A részecskék méretére vonatkozó becslésekhez az NP200-as jelű membránhoz a CPC200B kalibrációs gyöngyöket használtuk (átmérőjük módusza 203 nm), míg az NP400-as jelű membránhoz az SKP400D gyöngyöket (átmérők módusza 335 nm), a gyártó ajánlásai alapján ugyanabban az elektrolitban hígítva, mint a mérni kívánt

részecskék (jelen esetben RPMI médiumban 1:10 000-es hígításban). Mind a nanopórus-membránokat, mind a kalibrációs gyöngyöket az IZON Science-től rendeltük. Azokban a kísérletekben, ahol az EV-mentes sejtfelülűszo minőségét kívántuk ellenőrizni, a mérni kívánt mintához is adtunk ismert mennyiségű referenciagyöngyöt (az SKP400D kalibrációs gyöngyöket $4,5 \times 10^7$ részecske/mL-es végkoncentrációban), majd így is megismételtük a mérést, hogy kizárjuk annak lehetőségét, hogy csupán a nanopórus eltömődése miatt nem észleltünk nanorészecskék jelenlétére utaló jeleket.

3.2.4 Az EV-preparátumokat szennyező TNF jelenlétének kizárása

A CCRF sejtek kondicionált médiumában vagy az EV preparátumokban esetlegesen megtalálható TNF mennyiségét TNF DuoSet ELISA development kit (R&D Biosystems) segítségével ellenőriztük. Az ELISA vizsgálat kivitelezése során a gyártó ajánlásai szerint jártunk el.

3.3 Az EVk jelenlétében tapasztalható biológiai válaszok vizsgálata

3.3.1 RNS izolálás

Az U937 sejtek teljes RNS-tartalmának kivonása egy "PureLink Total RNA kit" (Ambion Life Sciences, Budapest) segítségével történt, a gyártó utasításai szerint. Az RNS tisztaságának és integritásának ellenőrzésére "Bioanalyzer RNA chip" (Agilent, Kromat, Budapest) mikrofluidikai rendszert használtunk, az RNS koncentrációját pedig NanoDrop spektrofotométerrel mértük le a gyártó által RNS meghatározásához ajánlott beállítások mellett.

3.3.2 Génexpressziós microarray vizsgálat

A jelölt cRNS az Agilent Low Input QuickAmp Kit segítségével készült a gyártó ajánlásai szerint, amely aztán egy 4×44 k Whole Human Genom oligo microarray (Agilent) lemezre került a globális génexpressziós változások kimutatása céljából. A génexpressziós microarray vizsgálat eredményeinek értékelése az alábbiakban részletezett módon történt. A tanulmányban szereplő génexpressziós vizsgálatok eredményeként kapott minden adatot elérhetővé tettünk az NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) [15] adatbázisán keresztül és így az adatbázis GEO Series felületén a GSE47897 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE47897>) azonosító révén bárki által előhívhatók.

3.3.3 *qRT-PCR*

A microarray módszerrel kimutatott globális génexpressziós változások megerősítésére az egyedileg is szignifikáns változásokat mutató gének közül a jelentősebbek kifejeződését valósidejű PCR-rel is vizsgáltuk. Az RNS izolálása után a reverz transzkripcióhoz a 40 μ L térfogatú reakcióelegy 2 μ L RNS-t, 5 mM végkoncentrációjú $MgCl_2$ -t, 10 mM végkoncentrációjú dNTP-t (Promega, Budapest), random primereket (Promega) és 2 μ L MuLV reverz transzkriptáz enzimet (Roche, Budaörs) tartalmazott, mely a reakcióelegyben 50 U/ μ L aktivitással bírt. A reakciókat Perkin Elmer DNA Thermal Cycler 480 típusú PCR készülékben kiviteleztük a következő beállítások mellett: 42 °C 40 perc, 99 °C 5 perc, majd 20 °C 5 perc. A kvantitatív valósidejű PCR reakciókban a HPRT (belső kontrollként szolgáló háztartási gén), CD36, CD82, CNR2, IL8, CCL2, CXCL2, NPC1, ICAM1, MMP9, és SMPD3 génekről átíródó mRNS-hez tervezett Taqman próbákat használtuk fel az egyes gének kifejeződésének vizsgálatára. Az egyedi gének kifejeződésének mértékét Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR készülék segítségével vizsgáltuk, a következő beállítások mellett: 20 perc 95 °C-on, majd 40 cikluson keresztül 1 másodperces 95 °C-os denaturáció után, 20-20 másodpercet hagytunk a bekötődésre és a láncmeghosszabbításra; mindkettőt 60 °C-on.

3.3.4 *U937 sejtek által termelt citokinek mennyiségének mérése*

Ahhoz, hogy kimutathassuk, vajon a génexpressziós változások a fehérjék mennyiségében is képesek változást eredményezni, az U937 sejtek felülszójában található IL-8 és CCL2 citokinek koncentrációját ELISA módszerrel mértük. IL-8 DuoSet ELISA development kit (R&D Biosystems, Biomedica, Budapest) illetve egy Human MCP-1/CCL2 ELISA kit (Sigma, Budapest) segítségével az említett citokinek koncentrációját a gyártó által ajánlott eljárást követve határoztuk meg.

3.3.5 *Kemotaktikus aktivitás felmérése*

A THP-1 humán monocita sejtvonal kemotaktikus válaszát egy NeuroProbe® MBB 96 kamra (NeuroProbe, Gaithersburg, MD, USA) segítségével határoztuk meg. A kemotaxis vizsgálat megkezdése előtt az U937 sejteket izolált MV-preparátumok jelenlétében tenyésztettük, TNF hozzáadása mellett, vagy anélkül. Ezután az U937 sejteket háromszor megmostuk (300g-s, 5 perces centrifugálás után PBS-ben vettük fel

a sejteket), annak érdekében, hogy a MVkat teljes mértékben eltávolítsuk a mintából. A stimulált (EVk és/vagy TNF jelenlétében tenyésztett) vagy stimulálatlan U937 sejtek kondicionált médiumát egy – a rendszer alsó kamrájaként szolgáló – 96-lyukú mikrotiter-lemez egyes lyukaiba helyeztük. A felülűszót tartalmazó alsó kamrától egy 5 µm-es pórusátmérőjű polikarbonát membrán (NeuroProbe) választotta el a THP-1 sejteket tartalmazó felső kamrát.

A két kamra között a sejtek szabadon közlekedhettek 3 órán keresztül, miközben a rendszert 37 °C-on tartottuk, 5 % CO₂-tartalom mellett. Az inkubációs idő leteltével a pozitív kemotaktikus választ adó – tehát az alsó kamrában található – sejtek számát az alamarBlue® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) eljárás segítségével határoztuk meg. A sejteket 8 órán keresztül tartottuk a festék jelenlétében, 37 °C-on és 5 % CO₂-tartalom mellett, majd egy LS-50B Luminescence Spectrometer (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) fluoreszcens módra is képes lemezolvasó segítségével, 570 nm-es excitációs és 585 nm-es emissziós hullámhosszak beállítása mellett mértük a mikrotiter-lemez egyes lyukainak a sejtszámmal arányos fluoreszcencia-intenzitását.

3.4 Adatelemzés

3.4.1 A microarray adatainak statisztikai értékelése

A génexpressziós microarray lemezről leolvasott fluoreszcenciaintenzitási adatokat az Agilent által fejlesztett GeneSpring GX szoftver segítségével alakítottuk génexpressziós értékekké és az adatalemzés első lépéseként ennek a szoftvernek a statisztikai értékelését használtuk fel. A mintákat négy csoportba sorolhattuk a recipiens sejteket ért hatások alapján. A kontroll csoport azoknak az U937 sejteknek a génexpresszióját mutatta, melyek EV-mentes médiumban és TNF hozzáadása nélkül növekedtek. Egy-egy csoportot alkottak azok a minták, melyek TNF vagy EVk jelenlétében növekvő U937 sejtekből származtak, míg a negyedik csoport mind EVk, mind pedig TNF hatásának ki volt téve. Mindegyik csoportba három-három, egymástól független kísérletből származó minta tartozott.

A további statisztikai elemzés során azokat a géneket vizsgáltuk, ahol legalább az egyik oligonukleotid szonda fluoreszcenciaértékei több mint kétszeres génexpressziós változást mutattak (akár növekedést, akár csökkenést) a kontroll csoporthoz képest és az intenzitás értékének leolvasása során nem keletkezett

hibaüzenet. Ezeknek a génexpressziós változásoknak a statisztikai jelentőségét egyutas ANOVA teszt segítségével állapítottuk meg, Tukey-féle post hoc tesztel, és a többszörös hipotézisekre vonatkozó Benjamini–Hochberg-féle korrekcióval kiegészítve. Statisztikailag szignifikánsnak értékeltük azokat a génexpressziós változásokat, ahol a korrekció utáni p érték 0,05-nél kisebbnek bizonyult.

3.4.2 A génkifejeződés szignifikáns változásához köthető funkcionális kategóriák keresése

A szignifikáns génkifejeződésbeli eltérések által befolyásolt biológiai funkciók azonosításához a PANTHER adatbázis (<http://pantherdb.org/>) [419, 420] gén ontológiai csoportosítását (GO), illetve a Reactome adatbázis (<http://www.reactome.org/>) [421, 422] fogalmi hálózatát vettük figyelembe. Az érintett gének fehérjetermékei közötti fizikai kapcsolatok lehetőségét, koexpressziós kapcsolatokat, valamint a közös funkcionális doméneket a GeneMania [423–425] platform (<http://genemania.org/>) segítségével térképeztük fel. Az EVk jelenlétében szignifikáns mértékben csökkent átíródást mutató géneket szabályozó miRNS molekulákat a miRWalk 2.0 [426, 427] adatbázisa (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/>) segítségével igyekeztünk azonosítani, az egyes transzkripció faktorok által szabályozott géneket pedig a RegNetwork [428] (<http://www.regnetworkweb.org/>) és a TRRUST [429] (<http://www.grnpedia.org/trrust/>) adatbázisokból kérdeztük le. Keresésünk során csak a kísérletesen validált célpontokat vettük figyelembe.

3.4.3 Génhalmaz alapú elemzés (GSEA)

Az egyedi gének kifejeződésében külön-külön megfigyelhető változások statisztikai elemzése mellett azt is vizsgáltuk, hogy különböző gének funkcionálisan összetartozó csoportjainak expressziója vajon együtt változik-e. Ez az alternatív megközelítés abból indul ki, hogy ha egy környezeti tényező hatására olyan génexpressziós változások következnek be, amelyek elősegítenek egy adott funkciót, akkor az abban szerepet játszó gének közül többnek is egyirányba fog változni a kifejeződésének mértéke. Ha ezzel szemben a funkcionális csoportnak csupán néhány eleme változik, vagy a változások iránya nem egyhangú, akkor valószínűbb, hogy az egyébként statisztikailag szignifikáns változást mutató gének asszociációja egy biológiai funkcióval csupán véletlenszerű egybeesés.

A Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) [430] módszeren alapul a Broad Institute honlapján szabadon hozzáférhető webes szolgáltatás (<http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>), melynek a GSEA v3.1 verzióját használtuk adataink elemzéséhez. Az eljárás részeként a vizsgált elemeknek az egyes csoportok közötti véletlenszerű összecszerelésével jönnek létre azok a csoportok, melyeket a statisztikai elemzés kontrollként tud felhasználni. Az egyes elemek a fenotípusos és a genotípusos csoportok között is kicserélhetők, de mivel esetünkben csak négy különböző fenotípusos lehetőséget vizsgáltunk, a szoftver fejlesztőinek ajánlásaival összhangban minden GSEA elemzésben a genotípusok alapján végeztünk el 1000 permutációt a statisztikai hipotézis ellenőrzése során.

A funkcionális géncsoportokat (gene sets) a Molecular Signatures Database (MSigDB v.3.1) [431] adatbázisból töltöttük le, az adatbázis c2, c3, c4 és c5 részeire koncentrálni. Nem használtuk fel az elemzésben azokat a géncsoportokat, melyekbe kevesebb, mint 15 gén tartozott, mivel itt nagyon kicsi a GSEA módszer statisztikai ereje; sem pedig az 500 génnél többet tartalmazó csoportokat, hiszen ott aránytalanul megnövekedett számítási igények mellett is nagyon nehéz lett volna statisztikai szignifikanciát elérni. A megmaradó géncsoportok közül választottuk ki azokat, melyekben 25% alatti téves találati arány (False Detection Rate, FDR) és 5 % alatti nominális p érték mellett is szignifikáns mértékben dúsultak fel az egyirányba változó gének. A Molecular Signatures Database c5 részében a gén ontológiai fogalmak alapján összeállított listák találhatók, a c3 részben pedig a miRNS molekulák és transzkripciósfaktorok által ismert módon szabályozott géncsoportok.

3.4.4 Az egyedi génekre összpontosító kísérletek eredményeinek statisztikai értékelése

A microarray eredmények statisztikai elemzésén túl egyutas ANOVA módszert használtunk az ELISA és a valósídejű PCR eredmények, valamint a kemotaktikus mérések kiértékeléséhez. Mivel itt az alacsony esetszám miatt nem lehetett normál eloszlást feltételezni, az elemzés során Kruskal-Wallis tesztet használtunk Dunn-féle *post hoc* teszttel kombinálva. Ezeknek a statisztikai elemzéseknek a kivitelezésében a GraphPad Prism v4 szoftver volt segítségünkre.

3.4.5 Az EVk és MVk által szállított fehérjék, illetve miRNS molekulák azonosítása

Az EVk által szállított fehérjék és miRNS molekulák csoportját az EVpedia [432, 433] adatbázisból kérdeztük le. A MVk fehérjekészletének összeírásához a szakirodalomban közölt nagy áteresztőképességű vizsgálatok eredményeire támaszkodtunk. Az „exosome” vagy „exosomes”, „microvesicle” vagy „microvesicles” vagy „microparticle” vagy „microparticles” és „proteome” vagy „proteomics” vagy „mass spectrometry” keresőszavak kombinációi segítségével a PubMed adatbázisból (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) letöltött cikkek közül azok adatait használtuk fel, melyekben – metodikájuk alapján feltételezhetően – valóban MVk alkották a vizsgált minta nagyobb részét. Kizártuk tehát az egyetlen nagysebességű (100 000g-s) ultracentrifugálási lépést alkalmazó cikkeket az elemzésből, és előnyben részesítettük a 10 000g és 40 000g közötti centrifugálással kiülepített struktúrákat vizsgáló tanulmányok adatsorait. Külön kezeltük azt az egy cikket, melyben a MVk forrásául ugyanaz a CCRF-CEM T-sejtes sejtvonal szolgált, mint a mi kísérleti rendszerünkben.

3.4.6 Adatbázislekérdezések automatizálása és az azonosítók megfeleltetése

A microarray vizsgálat elemzése során kapott adattömeg strukturált tárolásához és lekérdezéséhez Python v2.7 programnyelven [434] írt szkripteket hívtunk segítségül. Hasonlóképpen, a MVk fehérjekészletével kapcsolatban összegyűjtött adatok kezelésére, az egyes cikkek fehérjekészletének összehasonlítására és az ábrázoláshoz szükséges formátumba öntéséhez is Python nyelven írt szkripteket alkalmaztunk. Az automatizált lekérdezések eredményeinek értékeléséhez szükséges statisztikai teszteket a SciPy programcsomag függvényeivel végeztük el. A MVk fehérjekészletének részeként azonosított fehérjéről elérhető információk UniProt adatbázisból történő automatizált letöltéséhez és az adatbázisfájlok beolvasásához a BioPython programcsomag [435] megfelelő komponenseit használtuk fel. A különböző források által hivatkozott azonosítók közötti megfeleltetésben a UniProt adatbázis *ID mapping* szolgáltatását használtuk, melynek eredményeit szintén a BioPython programcsomag függvényei segítségével dolgoztuk fel.

3.5 Az eredmények szemléletes ábrázolása

3.5.1 Egy EV méretarányos modelljének ábrázolása

A – számítási kapacitásbeli korlátok alapján választott – 25 nm átmérőjű, lipidmembránból és néhány fehérje, illetve RNS összetevőből álló EV méretarányos modellének elkészítéséhez a Takamori és munkatársai [436] által modellezett szinaptikus vezikulából indultunk ki. A lipidmembrán elkészítéséhez 3100 db foszfatidilkolin molekulát helyeztünk el egymástól átlagosan 0,56 nm-re, de leglább 0,4 nm-re a külső membránrétegnek megfelelő gömb mentén, míg 1600 foszfatidilkolin molekulát a belső membránnak megfelelően a Packmol szofver [437] segítségével. Az így kapott PDB fájlt a PyMol modellezőprogram [438] segítségével jelenítettük meg és szerkesztettük.

Az EVk jellegzetes sejtfelszíni fehérjéjét, a CD63 molekulát hozzáférhető térszerkezeti adatok hiányában – a legközelebbi rokon fehérjének, a CD81-nek is csupán a nagy extracelluláris hurok térszerkezetét sikerült eddig meghatározni – a Swiss-Model [439] segítségével kialakított konformációban ábrázoltuk. Az MHC térszerkezetét a PDB adatbázis 1OGA azonosítójú bejegyzése alapján rajzoltuk fel [440]. Az enoláz 1 enzim szerkezetét a 2PSN azonosítójú bejegyzés (Hyo és munkatársainak nem közölt eredménye) alapján ábrázoltuk [441]. Az EVk belsejében egyik leggyakrabban kimutatott miRNS molekula, a let-7 miRNS Ago-1 fehérjével alkotott komplexének szerkezetét a 4KRF azonosítójú bejegyzésből emeltük ki [442]. Hogy az ábrán egy még látványosabb RNS hurok is megjelenhessen, az 1A4D azonosítójú, bakteriális 5S RNS molekula modelljét is elhelyeztük az EV belsejében [443].

3.5.2 A génkifejeződés alapján hasonlónak mutató csoportok hőtésképes ábrázolásmódja

A génexpressziós változások szemléletes megjelenítésére hőtésképes ábrázolásmódot (heatmap) is alkalmaztunk a GeneSpring szoftver beépített funkciói egyikének segítségével. Ehhez az ábrázolásmódhoz az egyes géneket hierarchikus klaszterezés segítségével csoportosítottuk a Pearson-féle központi hasonlóság érték és a középpontok összekötésének szabálya felhasználásával. Az egyes klasztereket, melyeken belül a génexpressziós változások mintázata nagy hasonlóságot mutat, egy "k átlag" klaszterezési algoritmus segítségével hoztuk létre.

3.5.3 *Egyes fehérjék közötti kapcsolatok hálózatos ábrázolása*

A vizsgált gének kapcsolatrendszerének szemléletes megjelenítésére hálózatos ábrázolásmódot alkalmaztunk, mely hálózatokat a Cytoscape v3.4.0 segítségével készítettük el [444, 445]. Ilyen ábrák készültek a GeneMania szoftver segítségével megalkotott koexpressziós és fizikai interakciós hálózatokból, illetve egyes gének és funkcionális kategóriák közötti kapcsolatok ábrázolásakor is. A GSEA módszer alapján a génexpressziós változások által leginkább érintett ontológiák szemléltetésére a Cytoscape Enrichment Map (GSEA-EM) plugin-jét használtuk [446]. A GSEA-EM által előállított hálózatok az alapértelmezett beállításokkal készültek (p értékének küszöbe 0,005; FDR küszöbe 0,1; átfedési koeficiens 0,5, kombinált konstans 0,5).

Mivel a gén ontológiai fogalmak gyakran átfednek egymással, vagy alá-fölé rendeltségi viszonyban vannak, a biológiai funkciók szempontjából az eredmények gyakran redundánsak. A redundancia csökkentése és a többszörösen alátámasztott eredmények kiemelése érdekében a GSEA módszer által szignifikánsnak tartott ontológiákból a Cytoscape Wordcloud plugin-je [447] segítségével készítettük el a szófelhőket, és a szavak együttes előfordulási gyakoriságát szemléltető hálózatot.

Az EVk belsejében leírt fehérjék és a TNF jelátviteli útvonal KEGG adatbázisban (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.genome.jp/kegg/>) nyilvántartott tagjai között feltátelezhető funkcionális kapcsolatokat a Cytoscape program KEGGscape plugin-je segítségével ábrázoltuk.

3.5.4 *Táblázatok és grafikonok*

Az adatsorok táblázatos megjelenítéséhez és egyes grafikonok elkészítéséhez a Microsoft Office Excel 2007 táblázatkezelőt alkalmaztuk. A gén ontológiák megoszlását mutató kördiagrammok és a génkifejeződés mértékét különböző kísérleti elrendezésekben bemutató szórásdiagrammokat a Python programnyelvet kiegészítő Matplotlib szkriptek [448] segítségével készültük.

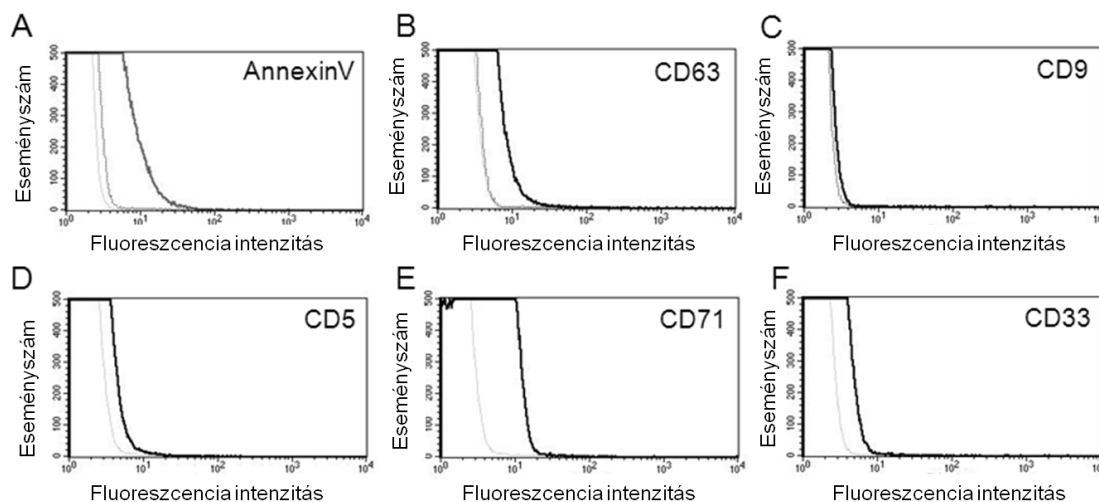
Az egyedi gének kifejeződését, fehérjetermékek mennyiségét, illetve a kemotaxis mértékét jelző grafikonok a GraphPad Prism v4 szoftverrel készültek. A MVk egyes tanulmányok által közölt fehérjekészlete közötti átfedéseket a Cytoscape program beépített Venn és Euler diagramm készítő funkciója segítségével ábrázoltuk. A könnyebb értelmezhetőség kedvéért az így kapott ábrákat leegyszerűsítve közöljük.

4 Eredmények

4.1 CCRF humán T-sejtes sejtvonal kondicionált felülúszójának jellemzői

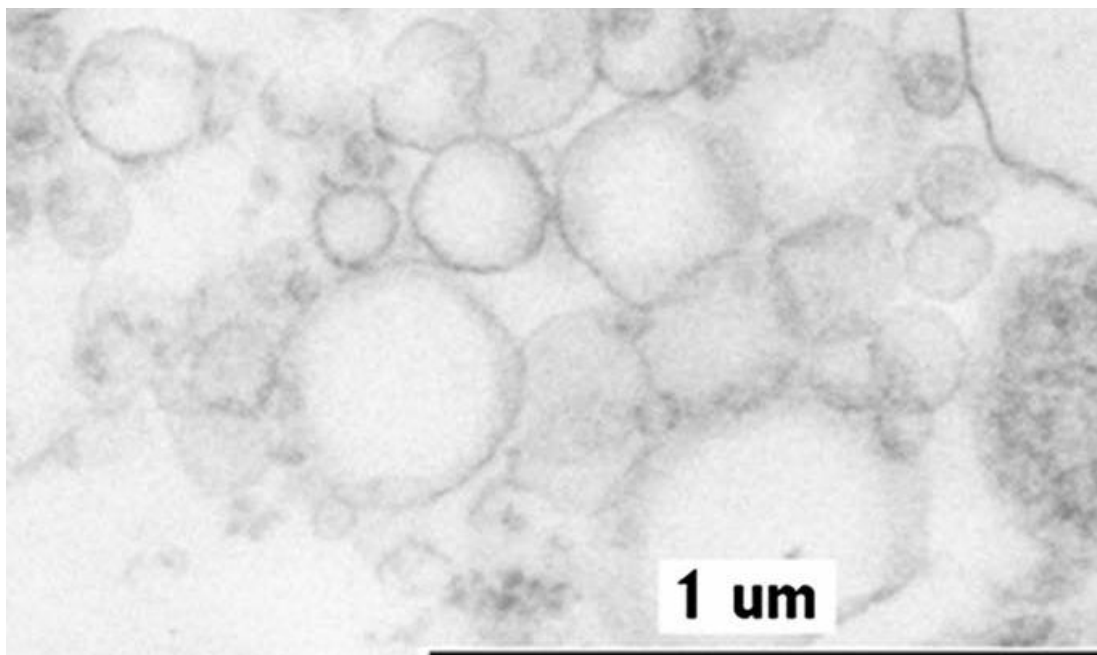
4.1.1 Az EVk jelenlétének kimutatása a sejtvonal felülúszójában és jellemzőik

Az EVk jelenlétének kimutatására alkalmas egyszerű módszer az áramlási citometria, mely során az EVk felszínén ismert módon előforduló antigénekhez kapcsolódó fluoreszcens jelölés segíti a detektálást. Áramlási citometriás eredményeink alapján a CCRF humán T-sejtes sejtvonal felülúszójában valóban megtalálhatóak voltak olyan struktúrák, melyek felszínéhez kötődött az annexin V, illetve jelen volt rajtuk CD63, CD71 és CD33 is. Csak alacsony mértékben sikerült CD5 jelenlétét kimutatni, CD9-re pedig az általunk vizsgált struktúrák negatívnak bizonyultak (4. ábra). Azt, hogy ezeket a jeleket valóban membránnal körülhatárolt vezikulák eredményezték, a munkacsoport által korábban kidolgozott [271] differenciál detergens lízis segítségével bizonyítottuk. Az EVk felszínéhez kötődő, jelölt molekulákból származó jel eltűnt 0,1% Triton X-100 jelenlétében, ami alapján kijelenthető, hogy a kimutatott antigének valóban membránnal határolt, vezikuláris struktúrákon voltak jelen.



4. ábra: A CCRF sejtek által kibocsátott EVk felszínén kimutatható antigének. A fekete kontúr jelöli az első mérés során kapott fluoreszcenciaintenzitás-hisztogramot, Szürke vonal jelöli a 0,1% Triton-X hozzáadása után tapasztalt jelintenzitást. [387]

Az EVk jelenlétének a jellegzetes antigéneket hordozó struktúráknál még erősebb bizonyítéka, ha sikerül közvetlenül képet alkotni róluk. Ehhez üledéket szükséges nyerni az EVk forrásául szolgáló folyadékból. A CCRF sejtek kondicionált médiumában található EVk további jellemzéséhez tehát 24 órán keresztül tenyésztettük a sejteket, melyekből ez alatt az idő alatt szabadon keletkezhetnek EVk. A kondicionált médiumból differenciálcentrifugálást végeztünk, és a 100 000g-s ultracentrifugálással nyert üledéket vizsgáltuk elektronmikroszkóppal.

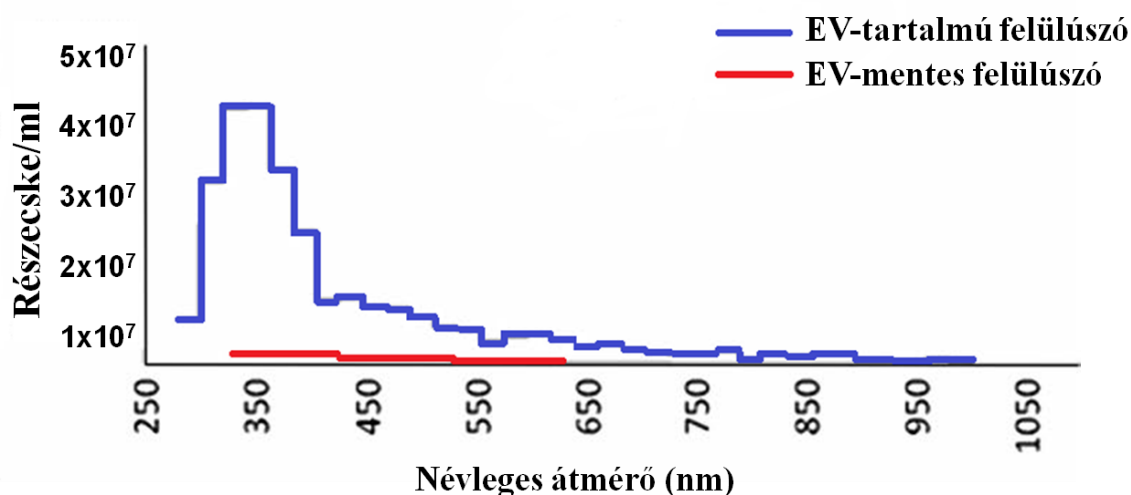


5. ábra: 100 000g-s ultracentrifugálás üledékében található EVk elektronmikroszkópos képe [387]

A vizsgált üledékben valóban láthatók EVk, amelyek a centrifugálás ellenére szemlátomást sértetlen állapotban vannak (5. ábra). Jól látható, hogy számos kerek, folytonos kettős lipidmembránnal körülvett és közepes elektrondenzitású anyaggal kitöltött struktúra került az üledékbe, amelyek többsége megközelítőleg a MVk mérettartományába esik. Elvértve láthatók az üledékben kisebb, csésze-alakú, de szintén folytonos membránnal körülvett struktúrák is, melyek morfológiájuk és méretük (100 nm körüli átmérőjük) alapján exoszómáknak felelhetnek meg.

A CCRF sejtek EV-tartalmú felülszójának egy részét IZON qNano készülék segítségével is lemértük az elektronmikroszkópos képek tanulsága alapján választott NP200-as és NP400-as membránokon. Ezzel a módszerrel a Coulter-elvnek megfelelően kisméretű részecskék számát és méreteloszlását lehet vizsgálni. Az NP200-

as membrán optimális mérettartományában a 150 nm-es átmérőnél nagyobb, de többségében 400-600 nm-nél kisebb részecskék detektálására nyílik mód. Igen kevés részecskét (és elsősorban a felső mérettartomány-határ közelében) sikerült detektálni, ezért a továbbiakban az NP400-as membránnal mért eredményekről lesz szó részletesebben.

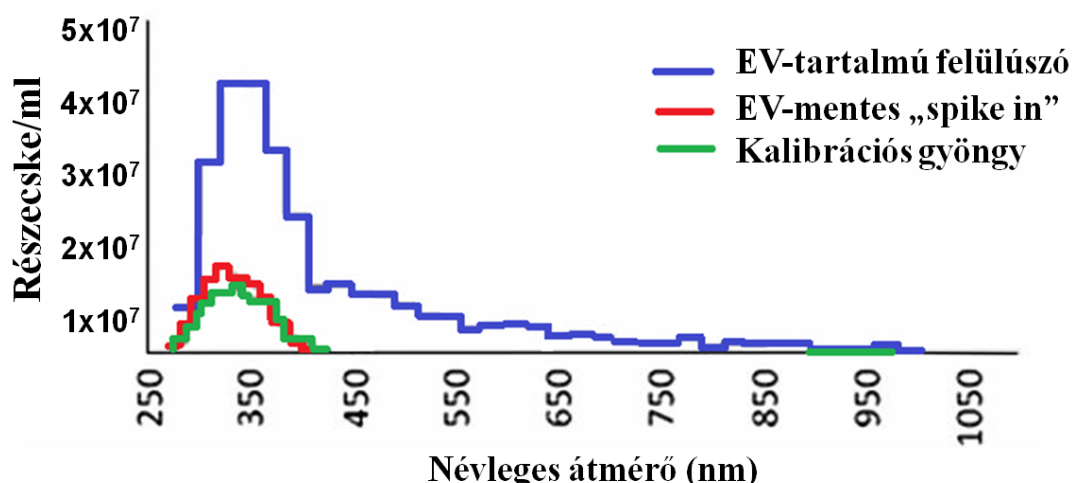


6. ábra: A CCRF sejtvonal által kibocsátott EVk méreteloszlása. Izon qNano készüléken, NP400-es membránnal mérve [387].

Az NP400-as membrán tapasztalataink szerint 250 nm-től közel 1 μm -ig képest a részecskék számának meghatározására. Ebben a mérettartományban sikerült is detektálni a CCRF sejtek felülúszójában található EVk egy jelentős részét (6. ábra), melyek többsége a 350 nm körüli módusz átmérő alapján feltételezhetően MV. A részecskeszámlálás eredményeiből kiindulva 1 ml sejtfelülúszóban a MVk mennyisége mintegy 2×10^8 nagyságrendűre becsülhető.

4.1.2 Az EVk sikeres eltávolításának ellenőrzése

Az ultracentrifugálással EV-mentesített sejtfelülúszóban sem áramlási citometriával, sem elektronmikroszkópiával, sem pedig a Coulter-elven alapuló részecskemérés segítségével nem voltak kimutathatók EVk. Áramlási citometriás méréseink során az annexin V hozzáadása után észlelt események száma alig különbözött a detergens lízis utáni eseményszámtól.

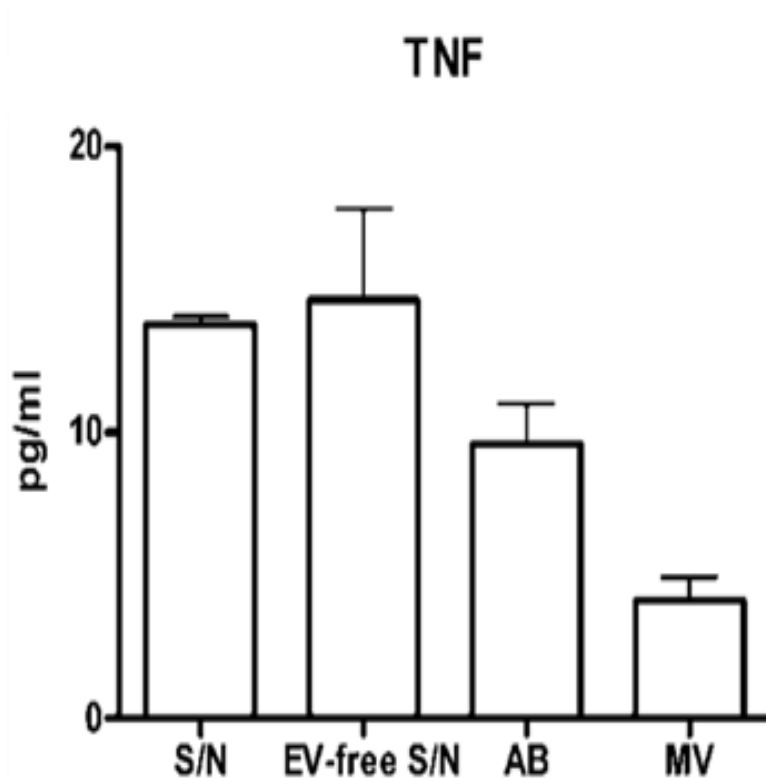


7. ábra: A CCRF sejtek EV-mentes felülúszójának „spike-in” mérése. CCRF sejtek 60 percig 100 000g gyorsulással ultracentrifugált felülúszóját kalibrációs gyöngyökkel dúsítva (EV-mentes felülúszó) kalibrációs gyöngyöket szűrt tenyésztőfolyadékban felvéve. Izon qNano készüléken, NP400-es membránnal mérve [387].

Azt kizárando, hogy a jelek hiánya mérés technikai műtermék lenne, a Coulter-elv szerinti mérés során az EV-mentes sejt felülúszóhoz ismert méretű és koncentrációjú kalibrációs gyöngyöt is adtunk. Ezeket a gyöngyöket a várt méreteloszlás mentén és az ismert koncentrációtartománynak megfelelő mennyiségben sikerült detektálni. Ha a kalibrációs gyöngyöket tartalmazó EV-mentes médiumban mérhető jelekből kivonjuk az üres RPMI médiumban felvett kalibrációs gyöngyök jelét (azaz a gyöngyök által adott komponenst), akkor az alapvonalat kapjuk vissza (7. ábra). Ez alapján kijelenthető, hogy a 60 perces, 100 000g-s ultracentrifugáláson alapuló vezikulamentesítési eljárásunkkal valóban eltávolításra kerültek az EVk, és ez a sejt felülúszó valóban felhasználható viszonyítási alapként.

4.1.3 TNF kimutatása az EV preparátumokból

Logikus felvetés, hogy akár maguk az EV-k, vagy éppen az EV-mentes felülúszó is tartalmazhat citokineket – különös tekintettel a TNF-re. Annak ellenőrzésére, hogy a CCRF humán T-sejtes sejtvonal felülúszója valóban tartalmaz-e TNF citokint, a kísérletek során felhasznált preparátumokat ELISA módszerrel ellenőriztük. Valóban sikerült is kimutatni 10 pg/ml nagyságrendbeli koncentrációjú TNF jelenlétét a CCRF sejtek felülúszójában, de szignifikáns különbséget nem találtunk a felülúszó, illetve az egyes EV frakciók TNF-tartalmában (8. ábra).

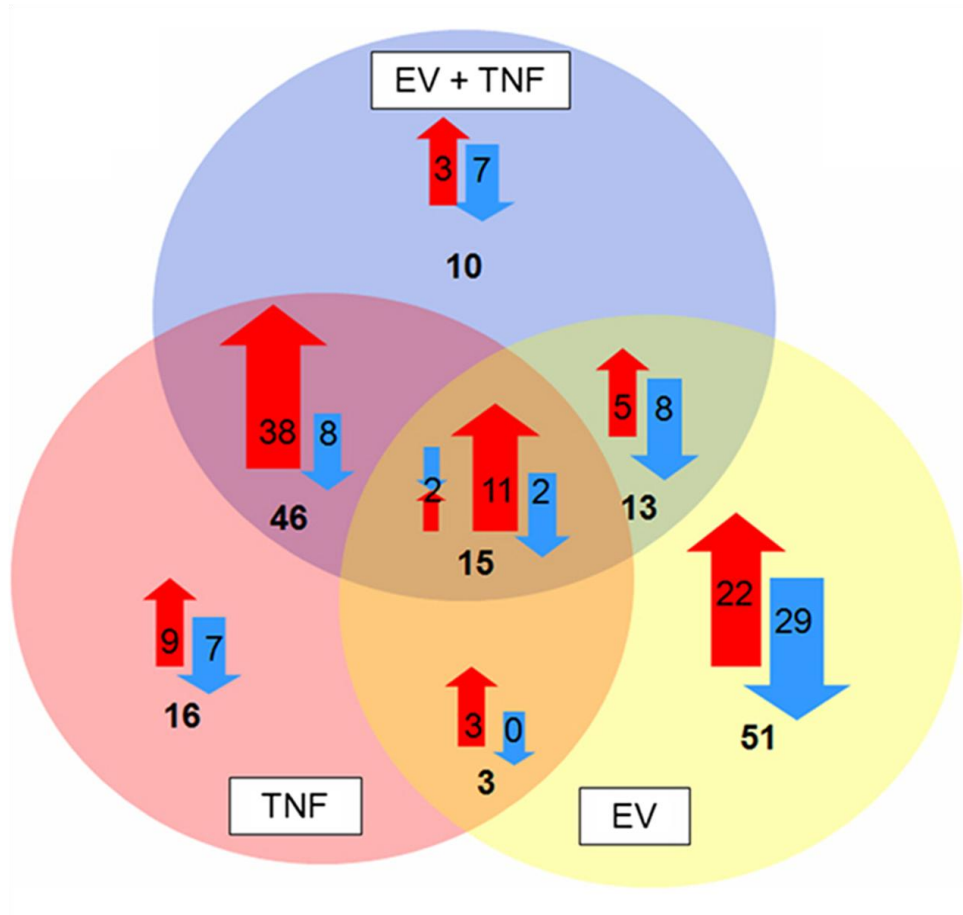


8. ábra: A CCRF sejtvonal felülúszójából izolált EV típusok TNF citokintartalma. A sejtmentesített felülúszó jelölése „S/N”, az EV-mentesített felülúszó az „EV-free S/N”, míg az „AB” apoptotikus testeket jelöl (ELISA) [387].

4.2 A CCRF T-sejtes sejtvonal által kibocsátott EVk és a TNF kombinatorikus hatása az U937 monocita sejtvonal génexpressziójára

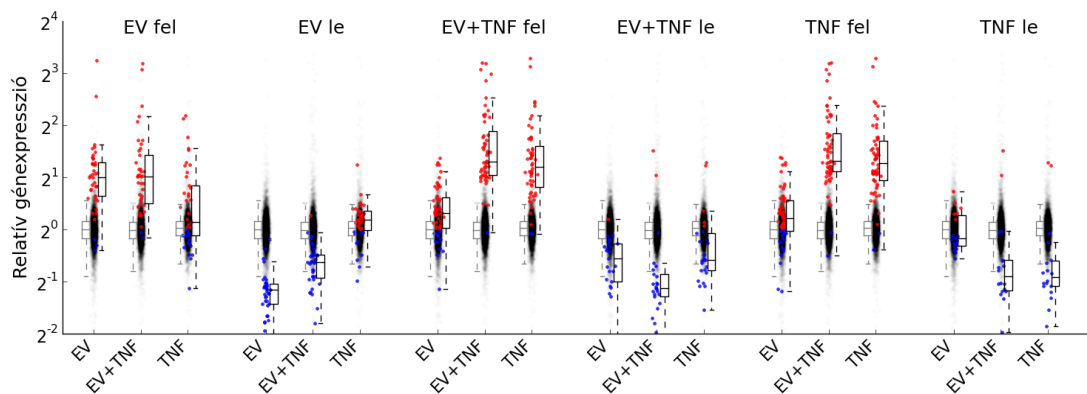
4.2.1 A vizsgált tényezők jelenlétében szignifikáns transzkripciós változást elszenvedő gének azonosítása

Az U937 humán monocita sejtvonal sejteinek globális génexpressziós változásait microarray módszerrel vizsgálva több, statisztikailag szignifikáns változást mutató gént és lókuszt találtunk. A kontroll mintához képest legalább kétszeres génexpressziós változást mutató (tehát biológiailag szignifikánsnak tekinthető) és jó minőségű fluoreszcens jelet adó génszondák közül egyutas ANOVA analízis alapján 202 változása bizonyult statisztikailag szignifikánsnak ($p < 0,05$), melyek 154 egyedi génhez vagy genetikai lókuszhoz köthetők. Ennek a 154 génnek a kifejeződésében bekövetkező változások irányát (növekedését vagy csökkenését) egy Venn-diagramon is ábrázoltuk (9. ábra).



9. ábra: Szignifikáns mértékben megváltozott kifejeződést mutató gének száma EVk, TNF vagy a két tényező egyidejű jelenlétében. A nyilak a génexpressziós változás irányát mutatják, a nyilakba és a Venn diagram területére írt számok pedig az adott halmazba tartozó elemek mennyiségét jelölik [387].

A kontroll minta (EV- és TNF-mentes felülúszó) hatásával páronként összehasonlítva az egyes kezelések hatását, azt találtuk, hogy TNF hatására 80, EVk hatására 82, kombinált kezelés hatására pedig 83 gén kifejeződése változott meg statisztikailag szignifikáns mértékben. Ebből az EVk hatására növekedett az átíródása 43 génnek és csökkent 39 génnek. A TNF jelenlétében ezzel szemben 61 gén esetében fokozott átíródást tapasztaltunk, míg csak 19 olyan gént találtunk, melyeknek szignifikánsan csökkent az átíródása. A két tényező együttes jelenlétében a TNF jelenlétében megfigyeltékhez valamelyest hasonló módon 57 gén átíródása fokozódott, míg csupán 26 gén kifejeződése csökkent.



10. ábra: Statisztikailag szignifikáns mértékben befolyásolt gének kifejeződése különböző kísérleti elrendezésekben. Sötét pontok és szürke boxplot jelölik az összes gén mérési eredményét magába foglaló háttér, míg színes pontok (pirossal a pozitív, kékkel a negatív változások) és fekete boxplot jelölik az adott kategóriába eső génekhez tartozó próbák esetében mért értékeket.

Az esetek többségében hasonló irányú volt a változás akkor, ha több mint egy kísérleti elrendezésben találtuk szignifikáns mértékben megváltozottak egy adott gén átíródását (10. ábra). A 154 génből csupán 2 kivételt találtunk, ahol az EVk jelenlétében csökkent, míg TNF, vagy EVk és TNF jelenlétében nőtt a génátíródás. Azonosítottunk továbbá 13 olyan gént, amelynek a kifejeződése mindhárom kísérleti elrendezésben változott a kontrolhoz képest. A legnagyobb átfedést a TNF és az EVk és TNF együttes jelenlétében tapasztalható változások között találtuk (46 gén), míg csak 3 olyan gént találtunk, melyek EVk hatására és TNF hatására is megváltozott átíródást mutattak, de a kombinált kezelés hatására nem.

Az EVk által befolyásolt gének közül a nagy többség (51 gén) átíródása csak EVk jelenlétében változott, míg a TNF hozzáadása mintegy kioltotta ezeket a változásokat, és a 82 génből csak 26 gén esetében figyelhattunk meg az EVk által kiváltottakhoz hasonló hatásokat akkor, ha a TNF is jelen volt a rendszerben. Ebből a 26 génből 13 kifejeződését maga a TNF is hasonló módon befolyásolta, mint az EVk, így csak 13 génről lehet kijelenteni, hogy valóban az EVk hatáskomponensét képviseli a kombinált kezelés esetén. Ezzel szemben áll a TNF hatáskomponensének tekinthető 46 gén, melyeket a TNF és a kombinált kezelés hatása egyaránt befolyásol. Mindössze 10 olyan gént találtunk, melyek kifejeződése a két tényező egyedi jelenléte mellett nem változott statisztikailag szignifikáns módon, hanem csak kombinációjuk jelenlétében.

1. táblázat: A microarray vizsgálat alapján szignifikáns változást mutató gének [387].

	Génreguláció	Jelátvitel	Metabolizmus	Vezikula transzport	Egyéb
Csak EVk jelenlétében fel	DMBX1, HILS, NEIL1, RPS26, SWT1, ZC3HAV1	CNR2, ERBB4, SMPD3, UBXN8	ALG14	AP3B2, CPLX3, MYO3B, SCG3, SYT11	LYSM1, NPC1, WFIKKN1
Csak EVk jelenlétében le	BOLA3, FJX1, NSFL1C	APITD1, CXCL14, HDHC3, MNAT1, MYCBP, PCSK5, TBXAS1, UBE2D4	GAMT, METTL10, THG1L	DYNLL1, IFT46, MFAP4, VPS4A, VPS54, VTI1B	CLEC2B, L3MBTL3, MFSD3, SCD, TMEM54, XK
Csak EVk és TNF jelenlétében fel		PPP1R15A, TOR3A			KLF6
Csak EVk és TNF jelenlétében le	RDM1			GOLPH3L	ABLIM1, CCDC121, L3MBTL1, SLC40A1
Csak TNF jelenlétében fel	ZFHX3	CD36, CD48, CD74, IL4I1, NFKBIE, TNFAIP6		EML1, STX1A	
Csak TNF jelenlétében le	POLD3, ZMAT1	BLNK, ICAM5	CTSS		CCDC11, SRGN
EVk és EVk és TNF jelenlétében fel	ZFYVE26	CD82, WDR81	DOLPP1		
EVk és EVk és TNF jelenlétében le	NKX2-1	AKAP7, MDP1, NKAPP1	MT1B		
TNF és EVk és TNF jelenlétében fel	IFIH1, NFE2L3	BCL3, BIRC3, CASK, CHRNA6, CXCL10, CXCL11, CXCL3, EGR2, ETS2, GHRL, GRP84, HBEGF,	CHST2, GFPT2, PYROXD2, UPB1		ADAMDEC1, MFSD2A, MMP9

	Génreguláció	Jelátvitel	Metabolizmus	Vezikula transzport	Egyéb
TNF és EVk és TNF jelenlétében fel (folytatás az előző oldalról)		HLA-DPA1, HLA-DPB1, ICAM1, IL8, KCNAB1, NFKB2, NFKBIA, NR2F2, PTGER4, PTX3, REPS2, S1PR2, SGK1, SLAMF8, TNFAIP3			
TNF és EVk és TNF jelenlétében le	RBM22	CD160, FOS, PLAC8			IGLL1
Minden esetben fel	HIVEP1, RBMS3	BCL2A1, CCL2, CXCL2, FCAR, GPR68, RELB, RGS1	CYP1A1		CHI3L1
Minden esetben le			RBKS		IGLL5
Ellentmondásos	ZMIZ3	IL17RA, PLA2G4C, CIITA		STX11	

Az egyes kísérleti változók által befolyásolt konkrét géneket kigyűjtve (1. táblázat) elmondható, hogy az EVk és TNF ellentétesen befolyásolják a CIITA és ZMIZ3 géneket, minek következtében az EVk jelenlétében nő, EVk és TNF együttes jelenlétében pedig csökken az átíródásuk. Mindhárom kezelés csökkenti az IGLL5 és a RBKS gének átíródását és növeli a BCL2A1, CCL2, CHI3L1, CXCL2, CYP1A1, FCAR, GPR68, HIVEP1, RBMS3, RELB és RGS1 génekét.

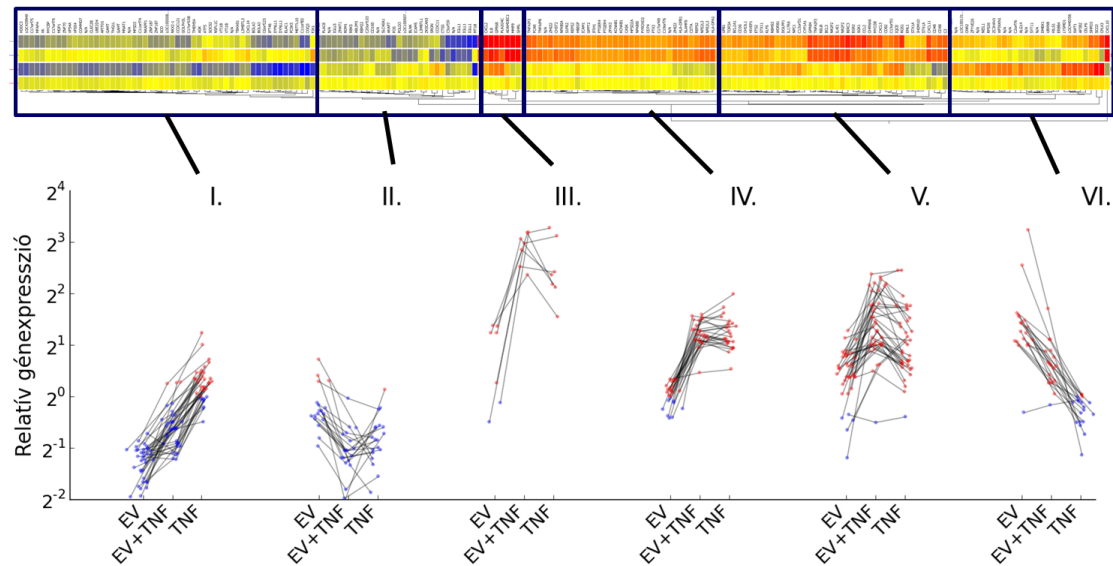
A TNF és az EVk együttes jelenléte esetén megfigyelt változásokkal kapcsolatban alapvetően a TNF hatása érvényesül az ADAMDEC1, BCL3, BIRC3, CASK, CHRNA6, CHST2, CXCL10, CXCL11, CXCL3, EGR2, ETS2, GFPT2, GHRL, GRP84, HBEGF, HLA-DPA1, HLA-DPB1, ICAM1, IFIH1, IL8, KCNAB1, MFSD2A, MMP9, NFE2L3, NFKB2, NFKBIA, NR2F2, PTGER4, PTX3, PYROXD2, REPS2, S1PR2, SGK1, SLAMF8, TNFAIP3, UPB1, CD160, FOS, IGLL1, PLAC8 és RBM22

gének esetében. A két tényező együttes jelenléte mellett az EVk tehetők felelőssé ezzel szemben a CD82, DOLPP1, WDR81, ZFYVE26, AKAP7, MDP1, MT1B, NKAPP1 és NKX2-1 gének átíródásának megváltozásáért. Csak az EVk és a TNF együttes jelenléte befolyásolja azonban a KLF6, PPP1R15A, TOR3A, ABLIM1, CCDC121, GOLPH3L, L3MBTL1, RDM1 és SLC40A1 gének kifejeződését, melyek szignifikáns változását nem sikerült kimutatni EVk és a TNF egyedüli jelenlétében.

Éppen fordított a helyzet az IL17RA, a PLA2G4C és a STX11 gének esetében, melyek átíródását a két tényező együttes jelenléte nem befolyásolja, hanem csak külön a TNF és külön az EVk. A CD36, CD48, CD74, EML1, IL4I1, NFKBIE, STX1A, TNFAIP6, ZFHX3, BLNK, CCDC11, CTSS, ICAM5, POLD3, SRGN és ZMAT1 esetében a TNF szintén csak egymagában képes befolyásolni a gének kifejeződését, míg az EVk egyidejű jelenléte mellett nem. Még több gén esetében figyelhetünk meg hasonló jelenséget csak EVk jelenlétében. Az ALG14, AP3B2, CNR2, CPLX3, DMBX1, ERBB4, HILS, LYSMD1, MYO3B, NEIL1, NPC1, RPS26, SCG3, SMPD3, SWT1, SYT11, UBXN8, WFIKK1, ZC3HAV1, APITD1, BOLA3, CLEC2B, CXCL14, DYNLL1, FJX1, GAMT, HDDC3, IFT46, L3MBTL3, METTL10, MFAP4, MFSD3, MNAT1, MYCBP, NSFL1C, PCSK5, SCD, TBXAS1, THG1L, TMEM54, UBE2D4, VPS4A, VPS54, VTI1B és XK gének átíródása statisztikailag szignifikáns módon megváltozik ugyan EVk hatására, azonban ilyen változást az EVk és TNF együttes jelenléte mellett nem sikerült kimutatni.

4.2.2 A génátíródás változásának mintázata alapján felállított géncsoportok (klaszterek)

Az EVk és a TNF hatása közötti összefüggések pontosabb megértése érdekében a kontrollhoz vagy egymáshoz képest statisztikailag szignifikáns eltérést mutató géneket (többutas ANOVA alapján $p < 0,05$) az egyes kísérleti elrendezésekben megfigyelt génexpressziós mintázatuk alapján kívántuk csoportosítani. A 197, statisztikailag és biológiailag egyaránt szignifikáns (a kontrollhoz képest legalább kétszeres változást mutató) génszonda 165 olyan génhez vagy genetikai lókuszhhoz köthető, melyek átíródása valamelyik kísérleti elrendezésben statisztikailag szignifikánsan eltérő módon alakult, mint a másik három esetben. Ezeket a géneket hat, jól elkülönülő csoportra (I-VI. klaszterek) osztottuk fel „k-átlag” klaszterezés segítségével (11. ábra).



11. ábra: A statisztikailag szignifikáns változást mutató gének expressziós mintázata alapján felállított géncsoportok (klaszterek). Piros szín jelöli a megnövekedett kifejeződést, kék pedig a csökkent értékeket. A sárga szín elhanyagolható mértékű változásra utal. Az egyes kísérleti elrendezésekben egy adott gén esetében mért értékeket egy vonal köti össze [387].

Az EVk hatása leginkább az I. és a VI. klaszterben volt jelentős, míg az ezekbe az osztályokba sorolt génekre a TNF-nek viszonylag kis hatása volt. Az I. klaszterbe 45 lókuszt tartozik, amelyek átíródása csökken az EVk hatására (azonosítható gének a AGK, APITD1, ATF5, BOLA3, CCDC121, CLEC2B, COMMD7, COQ3, CXCL14, DYNLL1, ELAC1, FJX1, GAMT, GOLPH3L, HDHC3, IFT46, L3MBTL3, MDP1, METTL10, MFAP4, MFSD3, MNAT1, MYCBP, NKAPP1, NKX2-1, NSFL1C, PCSK5, SCD, SOCS2, TBXAS1, TMEM54, UBE2D4, VPS4A, VPS5A, VT1B, XK, ZNF187 és ZNF70 voltak). A VI. klaszter ezzel szemben azt a 23 lókuszt tartalmazta, amelyeknek az EVk hatására fokozódott az átíródása (ezek közül azonosított gének az ALG14, AP3B2, CELF6, CNR2, CPLX3, CXCL10, DMBX1, ERBB4, HILS1, LYSMD1, NEIL1, RPS26, SCG3, SMPD3, SWT1, SYT11, UBXN8, WFIKK1, ZC3HAV1 és ZFYVE26 voltak). Mindkét klaszter esetében elmondható volt, hogy a génexpressziós változások iránya és mértéke hasonló volt akkor, ha csak EVk vagy EVk és TNF is jelen volt a sejtenyésző folyadékban.

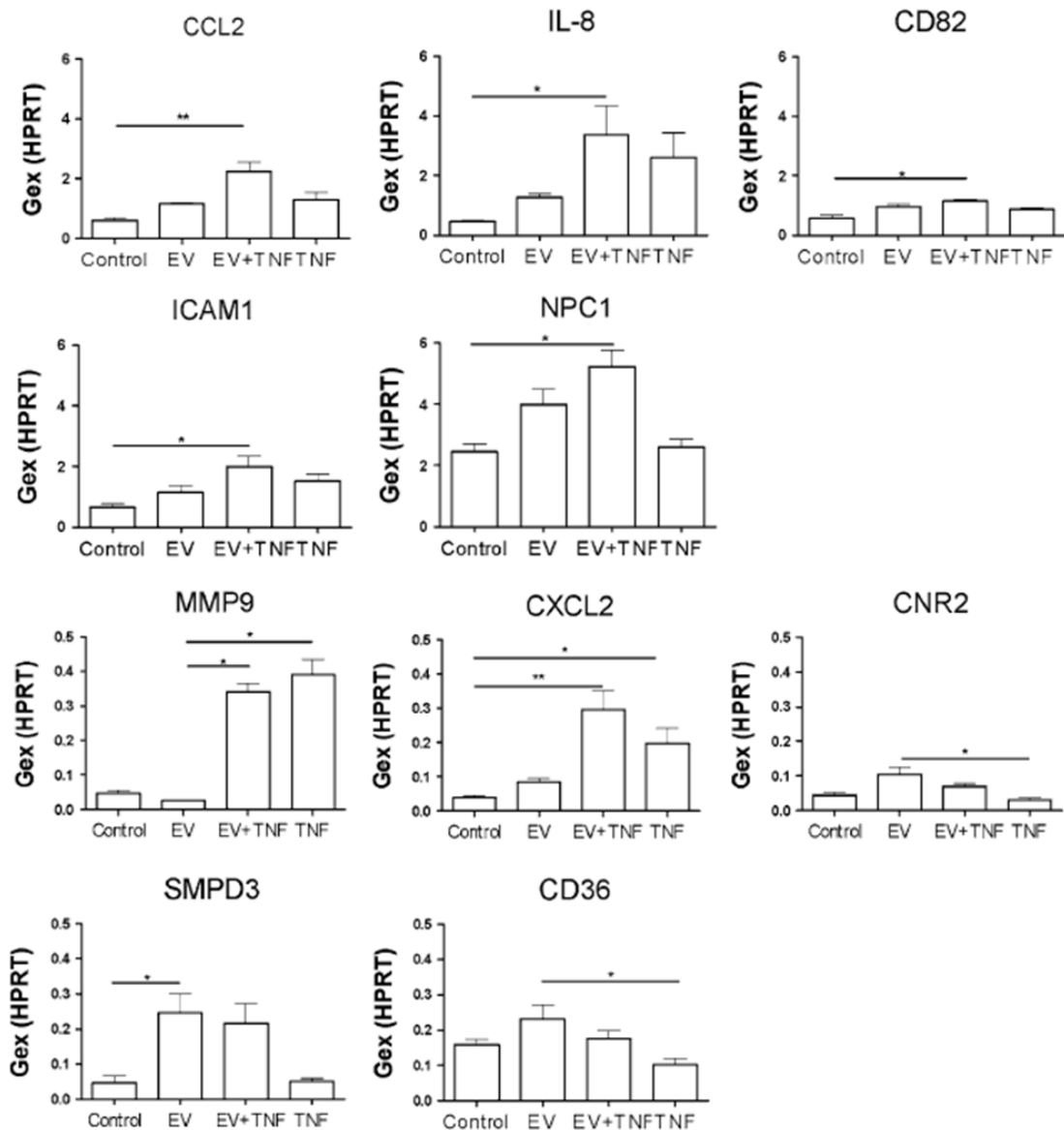
A II. klaszterbe ismét az a 24 lókuszt került, amelyeknek csökkent a kifejeződése a kontrollhoz képest, ám ebben az esetben a hatásért elsősorban a TNF volt felelős és az EVk hatása jelentéktelen volt (azonosítható gének az ABLIM1, AKAP7, BLINK, CCDC11, CD160, CTSS, FOS, ICAM5, IGLL1, IGLL5, L3MBTL1, MT1B, PLAC8, POLD3, RBKS, RBM22, RDM1, SLC40A1, SRGN, ZKSCAN3 és ZMAT1 voltak). A maradék három klaszterbe sorolt gének esetében a génátíródás fokozódását figyeltük meg, de elsősorban itt is TNF hatására. A III. (7 lókuszt) és a IV. klaszter (27 lókuszt) között alig fedezhető fel különbség, hiszen mindkét esetben közel azonos mértékű változást látunk a TNF és a TNF és EVk együttes jelenlétének hatása között. Ugyan a III. klaszter olyan géneket tartalmaz (ADAMDEC1, CXCL2, GHRL, GPR68, IL8, MMP9 és PLA2G4C), melyek átíródását az EVk önmagukban is fokozzák, de ez eltölpül a TNF sokkal markánsabb hatásához képest és a két tényező hatása között legfeljebb additivitás áll fent. A IV. klaszterbe sorolt gének esetében (CASK, CD74, CHST2, CIITA, GFPT2, HBEGF, HLA-DPA1, HLA-DPB1, ICAM1, IFIH1, KCNAB1, MFSD2A, NFE2L3, NFKB2, NFKBIA, NFKBIE, PTGER4, PTX3, PYROXD2, REPS2, S1PR2, SLAMF8, TNFAIP6, ZFH3, ZMIZ2) az EVk hatása még kisebb volt és az EVk és a TNF együttes hatása gyakorlatilag megegyezett a TNF egyedüli jelenlétének hatásával.

Az EVk és a TNF kölcsönhatása szempontjából talán a legérdekesebb gének az V. klaszterben találhatóak (BCL2A1, BCL3, BIRC3, C3, CCL2, CD36, CD48, CD82, CHI3L1, CHRNA6, CXCL11, CXCL3, CYP1A1, DOLPP1, EGR2, EML1, ETS2, GPR84, HIVEP1, IL14I1, IL17RA, IQCE, JHDM1D, KLF6, MYO3B, NPC1, NR2F2, PPP1R15A, RBMS3, RELB, RGS1, SGK1, STX11, STX1A, TNFAIP3, TOR3A, UPB1, WDR81). Ugyan a TNF és az EVk külön-külön is fokozták (néhány kivételtől eltekintve) ennek a 39 lókusznak az átíródását, az EVk és a TNF együttes jelenléte azonban akár még jelentősebb változást idézett elő a gének kifejeződésében.

4.2.3 A génátíródás változásának megerősítése az egyedi gének szintjén

A microarray módszerrel kimutatott globális génexpressziós változások alapján levont következtetéseink megerősítésére egyes kulcsfontosságú gének kifejeződését ellenőriztük kvantitatív, valósidejű PCR segítségével. A microarray vizsgálat eredményei alapján statisztikailag szignifikáns változást mutató, és több megközelítéssel is központi jelentőségűnek talált gének közül a funkcionális elemzések

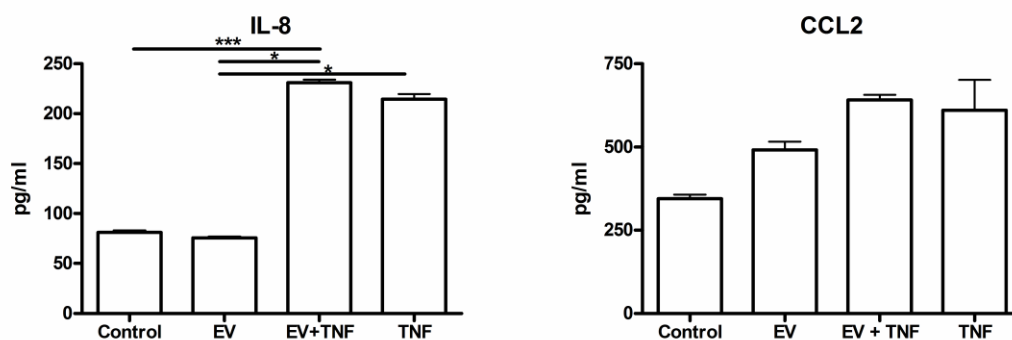
alapján az IL-8, a CCL2, a CXCL2, a CD36, a CD82, az ICAM1, az NPC1, a MMP9, a CNR2 és az SMPD3 gének kifejeződésének változását igyekeztünk megerősíteni. A gének átíródását a globális génexpressziós vizsgálat kísérleti felállásával megegyező körülmények között tanulmányozva a microarray vizsgálat eredményeivel jól összevethető adatokat kaptunk.



12. ábra: A microarray alapján leírt változások megerősítése az egyedi gének szintjén. A HPRT génre vetített relatív génexpressziós értékek (Gex(HPRT)) közötti statisztikailag szignifikáns eltéréseket és a szignifikanciaszinteket pontok jelölik (qRT-PCR) [387].

Mind a TNF, mind az EVk és a TNF együttes jelenléte fokozta a CCL2 génátíródását, statisztikailag szignifikáns változás azonban csak a két tényező együttes jelenlétében történt. Hasonló jelenséget figyelhattunk meg az IL-8, a CD82, az ICAM1, az NPC1 esetében (12. ábra). Ezekre a génekre vonatkozóan tehát még a globális génexpressziós vizsgálatok eredményeinél is markánsabban igaz az a megfigyelés, hogy az EVk és TNF együttes jelenléte erősebb hatással bír, mint a két tényező külön-külön, és ez a kölcsönhatás legalább additív. Elsősorban a TNF hatása érvényesült a MMP9 és CXCL2 gének átíródásában. Míg a CXCL2 esetében egyértelműen látszott, hogy a kontrollhoz képest a TNF az EVk jelenléte mellett és anélkül is fokozza kifejeződését - és ez statisztikailag szignifikánsnak is adódott. Az MMP9 esetében az EVk hatásához képest szignifikáns különbséget találtunk a TNF vagy az EVk és TNF együttes jelenléte hatásában.

Az EVk jelenlétében némiképpen fokozott átíródási tendenciát mutatott a CNR2, az SMPD3 és a CD36 gén. Statisztikailag azonban csak az SMPD3 esetében sikerült szignifikáns különbséget kimutatni az EVk jelenlétében és azok hiányában mérhető génkifejeződés között. Az EVk hatásának jelentőségét támasztja alá továbbá az SMPD3 esetében az is, hogy statisztikai szignifikanciát el nem érő mértékben, de tendencia szintjén mégis fokozódott a génexpresszió EVk és TNF együttes jelenléte esetén. A CNR2 és a CD36 esetében a statisztikai szignifikanciát az EVk egyedüli jelenléte és a TNF egyedüli jelenléte között tudtuk kimutatni.

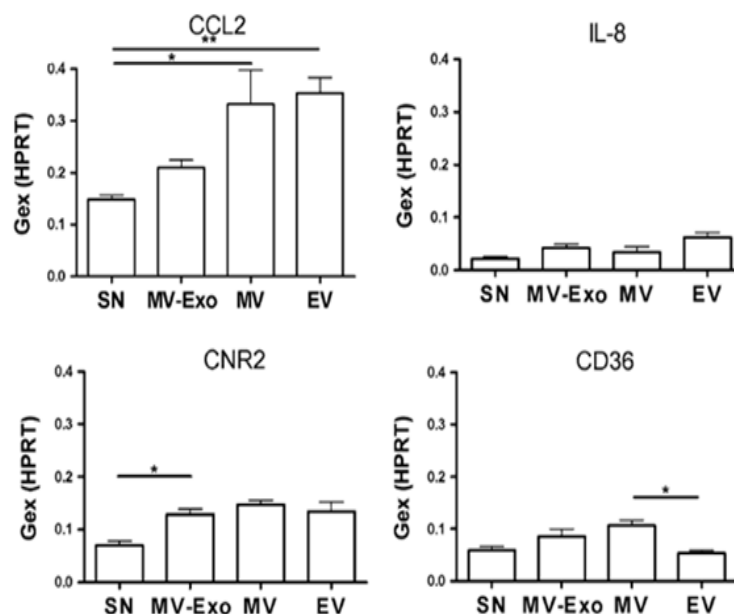


13. ábra: Az IL-8 és a CCL2 gének fehérjetermékeinek szintje a vizsgált kísérleti tényezők jelenlétében. Az U937 sejtek felülúszójában mért fehérjekoncentráció értékek közötti statisztikailag szignifikáns különbséget csillagok jelölik (ELISA) [387].

A génátíródás szintjén megjelenő változások mellett az is vizsgáltuk, hogy a génkifejeződés fokozódása együttjár-e a fehérjetermékek mennyiségének fokozódásával. Két kulcs kemokin, a CCL2 és az IL-8 szintjét az U937 sejtek felülszójában ELISA módszerrel mérve ($n = 6$) azt találtuk, hogy bár a CCL2 szintjének emelkedése nem éri el a statisztikai szignifikancia szintjét EVk, TNF vagy a kettő együttes jelenlétében, az IL-8 szintje egyértelműen, statisztikailag szignifikáns módon emelkedett a TNF, illetve a TNF és EVk együttes jelenlétében (13. ábra).

4.2.4 A sejtfelülszóban található EVk jelenlétében megfigyelt hatások igazolása izolált EVk felhasználásával

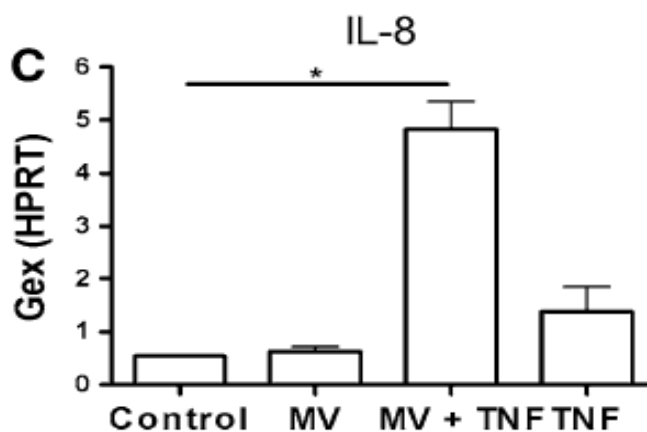
Nem zárható ki, hogy a globális génexpressziós vizsgálatokhoz felhasznált EV-tartalmú kondicionált médium több különböző EV típust tartalmazott, és ezek nem azonos mértékben vették ki a részüket az általunk megfigyelt változások előidézéséből. A CCRF sejtvonal felülszójának jellemzése alapján elsősorban MVk és jóval kisebb mennyiségben exoszómák jelenlétével számolhatunk, így az eredményeink szempontjából legfontosabb EV frakció azonosítására is MV preparátumot, illetve egy, a MVk és exoszómák által együttesen alkotott mintát állítottunk elő.



14. ábra: Izolált EV preparátumok jelenlétében végbemenő génexpressziós változások összehasonlítása. A HPRT génre vetített relatív génexpressziós értékek (Gex(HPRT)) közötti statisztikailag szignifikáns eltéréseket és a szignifikanciaszinteket csillagok jelölik (qRT-PCR) [387].

Az EVk nagyobb spektrumát tartalmazó kondicionált sejt felülúszóhoz képest csak a CD36 esetében találtunk szignifikáns eltérést, amennyiben az izolált MVk jobban fokozták a gén kifejeződését (14. ábra). A CNR2 génjének átírodását ebben a kísérleti rendszerben csak az exoszómák és MVk keverékét tartalmazó minta hozzáadása fokozta statisztikailag szignifikáns mértékben, jóllehet hasonló tendenciákat a MV-tartalmú és a teljes EV-spektrumot tartalmazó kondicionált médium esetében is megfigyelhettünk. A CCL2 kemokin esetében pedig éppen fordított helyzetet láttunk, ugyanis az exoszómákat is tartalmazó preparátum jóval kisebb mértékben, a statisztikai szignifikanciát el sem érő módon befolyásolta a CCL2 génjének kifejeződését, míg a MVk és az EV-tartalmú kondicionált médium egyaránt statisztikailag is szignifikáns módon fokozta a gén átírodását. Az IL-8 esetében viszont ebben a kísérleti rendszerben nem sikerült kimutatni statisztikailag szignifikáns génexpressziós különbséget egyik EV-típus jelenlétében sem az EV-mentes kondicionált médiumhoz képest.

Bár azt sikerült kimutatni, hogy az általunk hozzáadott mennyiséggel összevethető koncentrációjú TNF nincs jelen sem a CCRF humán T-sejtes sejtvonal felülúszójában, sem pedig az EV preparátumokban, mégsem volt teljesen kizárható valamely citokin jelenléte a vizsgált mintákban. Eredményeink alapján az EVk jelenlétében megfigyelt hatások legnagyobb részéért továbbá a MVk tehetők felelőssé. Legfontosabb kísérleteket ezért úgy is megismételtük, hogy üres RPMI médiumban vettük fel a CCRF sejtek által kibocsátott MVk üledékét.



15. ábra: Az IL-8 génjének kifejeződése olyan kísérleti rendszerben, ahol a jeátvivő anyagokat üres RPMI médiumban vettük fel. A HPRT génre vetített relatív génexpressziós értékek (Gex(HPRT)) közötti statisztikailag szignifikáns eltéréseket és a szignifikanciaszinteket csillagok jelölik (qRT-PCR) [387].

Ha az U937 sejteket RPMI médiumban reszuspendált MV frakció és/vagy 10 ng/mL TNF jelenlétében tartottuk, csak abban az esetben lehetett igazolni az IL-8 gén kifejeződésében szignifikáns változást, ha mindkét tényező együttesen jelen volt (15. ábra). Az IL-8 génjének átíródása ráadásul jóval nagyobb mértékben fokozódott, mint akár MVk, akár TNF jelenlétében, mely akár egy egyszerű additív kölcsönhatásnál többre is utalhat.

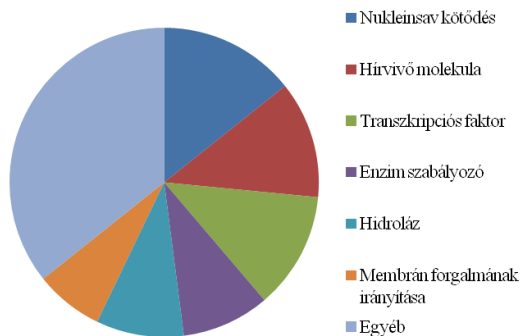
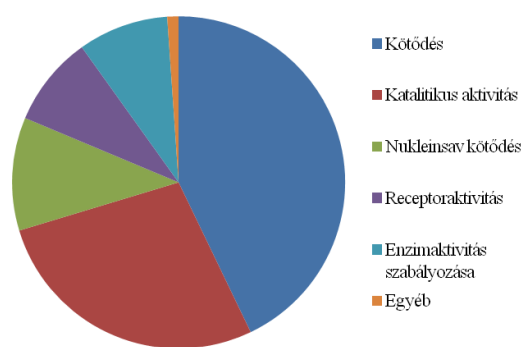
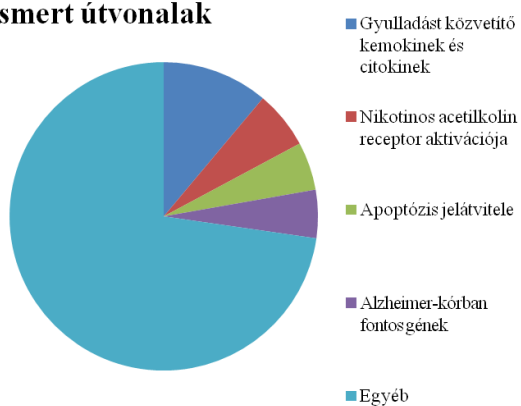
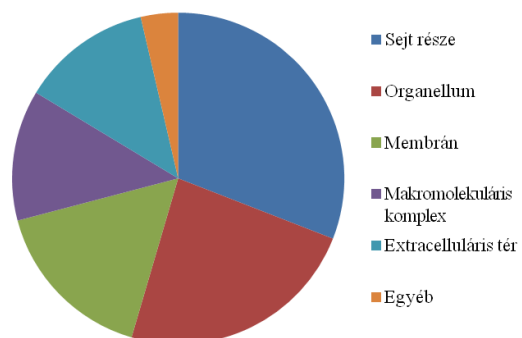
4.3 Az EVk, illetve a TNF jelenlétében megfigyelt változásokkal összefüggésbe hozható biológiai folyamatok

4.3.1 A szignifikáns változást mutató génekhez köthető biológiai folyamatok

Elsőként az EVk jelenlétében statisztikailag szignifikáns mértékben megváltozott kifejeződést mutató gének által kódolt fehérjék biológiai szerepét igyekeztünk azonosítani a PANTHER adatbázis [419, 420] gén ontológiái (GO) alapján (16. ábra). Az adatbázisból lekérdezhető eredmények szerint elsősorban olyan fehérjék génjének átíródása változik meg EVk jelenlétében, melyek legfontosabb szerepe a kötődés (pl. receptorok, transzkripciós faktorok). Ezek a fehérjék továbbá többnyire az intracelluláris térben, valamilyen sejtszervecskén helyezkednek el.

Ha ugyanezeket az ontológiákat külön-külön, az EVk jelenlétében megnövekedett, illetve csökkent átíródást mutató gének csoportjaira vetítve vizsgáljuk, akkor igen hasonló eredményeket kapunk (külön nem ábrázolva), azzal a különbséggel, hogy a katalitikus aktivitással rendelkező fehérjék génjei valamivel többen tartoznak a csökkent génkifejeződést mutató csoportba, mint a megnövekedett expressziót mutató gének közé. A csökkent átíródást mutató gének között találjuk továbbá azokat az EVk jelenléte által befolyásolt géneket, melyek valamely sejtorganellum fehérjét kódolják (DYNLL1, IFT46, MFSD3, MNAT1, NSFL1C, VPS4A, VPS54 és VTI1B).

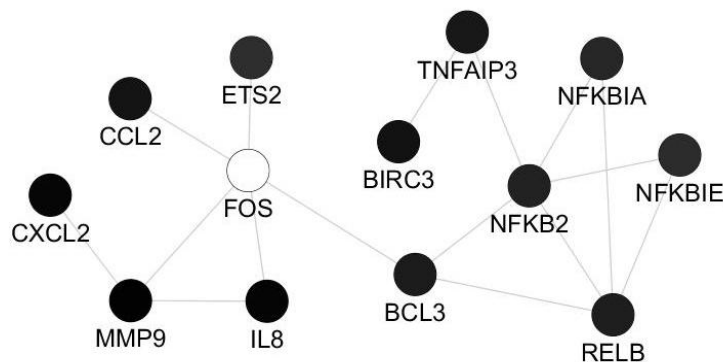
Érdekes módon, ezek a fehérjék ráadásul szintén fontosak az intracelluláris vezikulák forgalmának irányításában. A citokinek és kemokinek által közvetített gyulladásos útvonal (CCL2, MYO3B, RELB, RGS1) minden általunk kimutatott tagjának fokozódott a kifejeződése EVk jelenlétében. Statisztikai megközelítéssel vizsgálva valamely útvonal vagy ontológia tagjainak felülreprezentáltságát a humán proteomhoz képest azonban nem kaptunk olyan szignifikáns eredményt, amely a Bonferroni korrekció próbáját is kiállta volna.

Funkcionális fehérjecsoportok**Molekuláris funkciók****Ismert útvonalak****Sejten belüli elhelyezkedés**

16. ábra: Az EVk jelenlétében szignifikáns módon megváltozott génekhez köthető ontológiák megoszlása. A GO PANTHER adatbázis alapján készült ábrán az egyes kategóriák az összes megváltozott átíródást mutató gén közül az adott kategóriával összefüggésbe hozható gének aránya alapján vannak sorba rendezve.

A TNF jelenlétében statisztikailag szignifikáns módon megváltozott génekhez köthető funkciók között szintén a receptor és transzkripció faktor aktivitást, valamint az enzimekkel kapcsolatos folyamatokat találunk túlsúlyban. A TNF ismert hatásának megfelelően elsősorban az apoptózis útvonalának és más immunológiai folyamatoknak (gyulladás, T-sejtek és B-sejtek aktivációja, mintázatfelismerő receptorok általi felismerés) a tagjai érintettek. Ezek a gének jelentős részben sejtmembránhoz kötött vagy extracelluláris térbe kibocsátott fehérjéket kódolnak. Ettől alig tér el az EVk és a TNF együttes jelenléte mellett megfigyelt változások biológiai relevanciája. Statisztikailag szignifikáns felülreprezentációt azonban ehhez a két kísérleti elrendezéshez sem sikerült kötnünk.

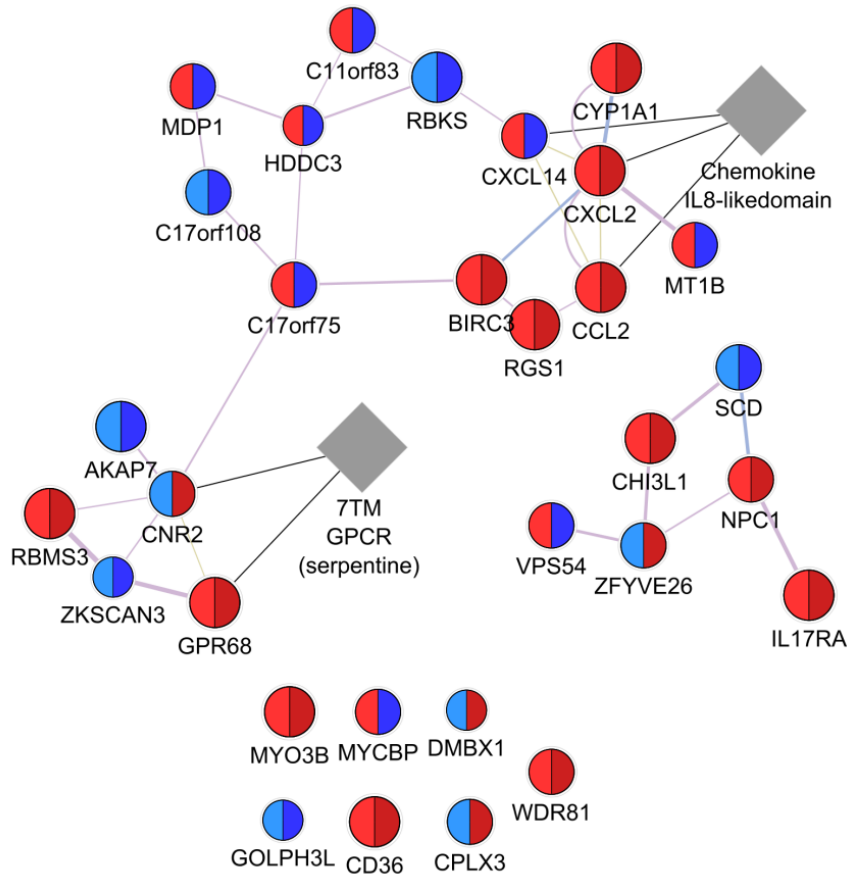
A gén ontológiákhoz hasonló fogalomrendszer érhető el a Reactome adatbázisban is, amely nemcsak egyes biokémiai reakciókban résztvevő géneket és géntermékeket tart nyilván, hanem magukat a reakciókat is hierarchikus hálózatba rendezi. Amennyiben ezen a hálózaton belül keressük a legnagyobb átlagos változást elszenvedő tagsággal rendelkező csoportokat, csak néhány, jellemzően csökkent kifejeződést mutató csoportot találunk. Érdekes azonban megjegyezni, hogy ezek közül számos csoport hozható összefüggésbe valamilyen jelátviteli útvonallal. Kismértékben csökkenő tendenciát mutat EVk jelenlétében az FGFR1, és a WNT útvonal génjeinek kifejeződése, míg az ERK jelátvitel fokozottabbnak mutatkozik.



17. ábra: Fizikai interakciók TNF jelenlétében megváltozott átíródást mutató gének fehérjetermékei között. A statisztikailag szignifikáns változást elszenvedő gének között leírt fizikai kapcsolatok közül a GeneMania elemzése alapján leginkább releváns éleket és a legnagyobb elemszámú hálózatot ábrázoltuk (a sötét csomópontok megnövekedett, a világosak csökkent kifejeződést jelölnek).

Mivel a gén ontológiák közül minden kísérleti elrendezésben előkelő helyen szerepelt a kötődés jelentősége, felmerült, hogy a változások által érintett gének fehérjetermékei egymással fizikai interakciót is létesíthetnek. Ennek a lehetőségnek a vizsgálatához a GeneMania [423–425] platform segítségével igyekeztünk felderíteni az egyes gének közötti funkcionális kapcsolatokat (ismert koexpresszió, kolokalizáció, génkölsönhatások vagy a géntermékek közötti fizikális kapcsolat, esetleg hasonló funkcióval rendelkező domének jelenléte). A legnagyobb kiterjedésű, fizikai kölcsönhatáson alapuló hálózat a TNF jelenlétében megváltozott kifejeződést mutató gének között rajzolódott ki (17. ábra).

Az EVk és TNF együttes jelenléte mellett megváltozott átíródást mutató gének között is hasonló, bár kisebb hálózat bontakozott ki (a NFKBIE hiányzott). Ezen túlmenően azonban csak igen kevés fizikális kapcsolatot találtunk a megváltozott kifejeződést mutató gének között (például a HLA-DPA1 és HLA-DPB2 vagy a CD48 és ICAM). Az EVk által befolyásolt génekhez pedig csak egyetlen fizikális kapcsolatot tudtunk hozzárendelni (a NPC1 és a VPS4A között).



18. ábra: Az EVk egyedüli és a TNF citokinnal egyidejű jelenléte közötti legnagyobb eltérést mutató gének hálózata. A csomópontok bal oldalán a TNF, jobb oldalán az EVk hatása, a kék szín csökkenést, a piros növekedést jelez [387].

Végül a TNF hatásának EVk általi befolyásolását olyan megközelítéssel is megpróbáltuk kimutatni, hogy az EVk és TNF együttes jelenlétében a TNF hatásától szignifikáns eltérést mutató géneket és az azok között fellelhető funkcionális kapcsolatokat vizsgáltuk (18. ábra). Az egyes genetikai lokuszokat körök jelképezik, melyek színe az átíródás mértékét jelzi a kontrollhoz képest. A jobb oldali félkör színe a TNF hatására utal, míg a baloldalié az EVk hatására. Ebben a géncsoportban a

GeneMania elemzése alapján több olyan gén is van, melyek tartalmazzák az Il-8 kemokinszerű domént (CCL2, CXCL2 és CXCL14), míg a CNR2 és GPR68 két, a membránt kétszer átérő transzmembrán receptor.

4.3.2 A génkifejeződés változása által halmozottan érintett géncsoportok

Teljesen eltérő, gének helyett génpanelekre összpontosító megközelítést képvisel a GSEA módszertana [430], amely nem csak a statisztikailag szignifikáns változást mutató géneket veszi figyelembe, hanem minden, módszertanilag megalapozott eredményt adó génszonda adatait.

2. táblázat: Az EVk jelenlétében megfigyelhető génexpressziós változások GSEA módszer alapján feltételezhető biológiai relevanciája a MSigDB/c2 és c5 alapján

	Gén ontológia (biológiai folyamat)	A génpanel mérete (db)	Dúsulási pontszám	Normalizált pontszám	Nominális p érték	FDR q érték
1.	POSITIVE_REGULATION_OF_TRANSCRIPTION_FROM_RNA_POLYMERASE_II_PROMOTER	39	0,55	1,85	0,000	0,232
2.	JAK_STAT_CASCADE	17	0,67	1,84	0,003	0,124
3.	REGULATION_OF_I_KAPPAB_KINASE_NF_KAPPAB_CASCADE	65	0,47	1,73	0,000	0,284
4.	BRAIN_DEVELOPMENT	17	0,61	1,67	0,016	0,406
5.	I_KAPPAB_KINASE_NF_KAPPAB_CASCADE	79	0,43	1,66	0,000	0,378
6.	NUCLEAR_EXPORT	21	0,57	1,64	0,010	0,393
7.	CENTRAL_NERVOUS_SYSTEM_DEVELOPMENT	45	0,48	1,63	0,005	0,357
8.	INFLAMMATORY_RESPONSE	61	0,46	1,62	0,004	0,338
9.	POSITIVE_REGULATION_OF_I_KAPPAB_KINASE_NF_KAPPAB_CASCADE	61	0,45	1,61	0,009	0,347
10.	REGULATION_OF_SIGNAL_TRANSDUCTION	125	0,39	1,6	0,003	0,319

A továbbiakban ezzel a sokkal globálisabb rálátást biztosító módszerrel vizsgáltuk, hogy a gén ontológiai fogalmak által meghatározott géncsoportok, valamint a KEGG, Reactome és Biocarta adatbázisok funkcionális csoportjai (MSigDB adatbázis c5 és c2 szekciója) közül melyek mutatnak szignifikáns dúsulást a kontrolhoz képest

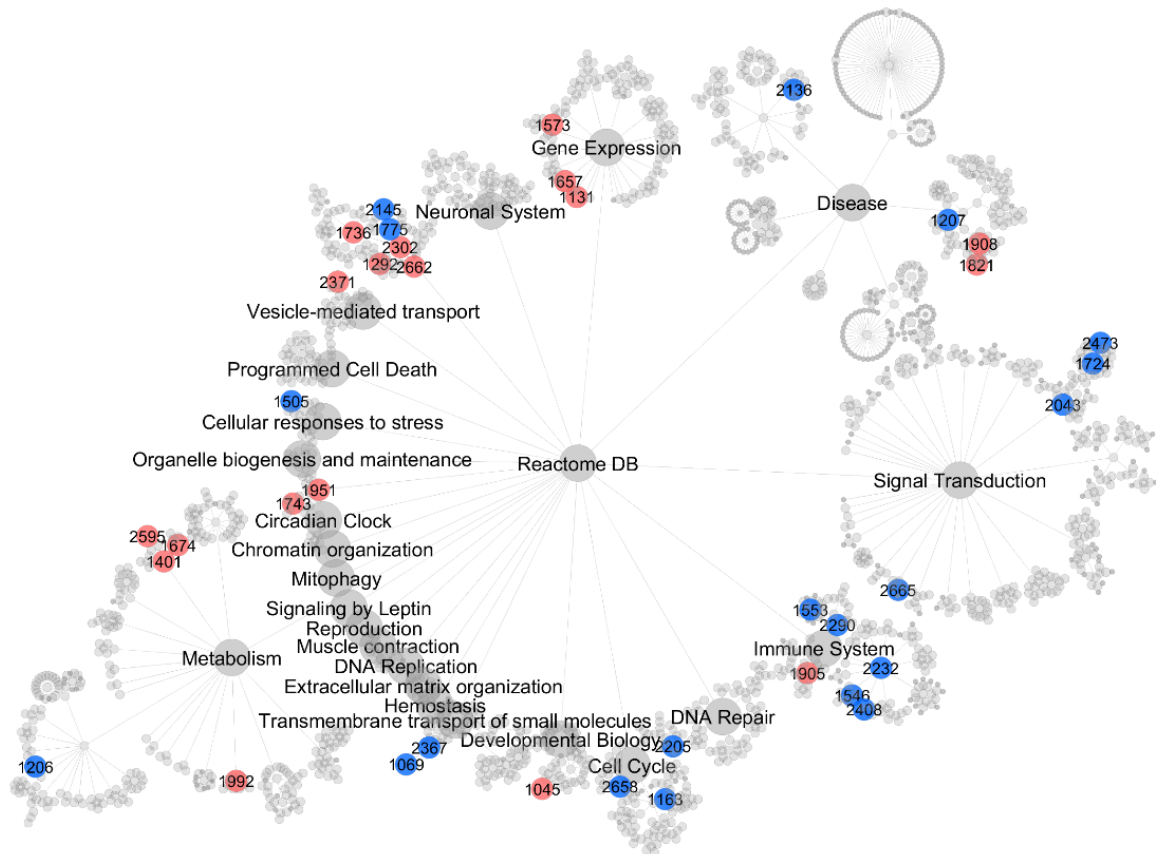
EVk, TNF, vagy a két tényező együttes jelenléte esetén. Az EVk jelenléte által befolyásolt biológiai folyamatokra utalhat a kontrollhoz képest legnagyobb dúsulási pontszámot elért 10 GO fogalom (2. táblázat).

Ezek között találjuk az immunválaszt, illetve az immunológiai folyamatokban is fontos szerepet játszó JAK/STAT kaszkádot és az NFκB jelátviteli utat. A fogalmak közötti redundanciát is jól mutatja az NFκB jelátvitel többszöri feltűnése ennek az egyetlen adatbázis résznek egy adott kísérleti tényezőre vonatkozó lekérdezése után. Hasonló eredményeket kapunk a lekérdezést a Reactome adatbázisra szűkítve (3. táblázat és 19. ábra).

3. táblázat: A GSEA elemzés alapján EVk jelenlétében legnagyobb pozitív és negatív dúsulást mutató fogalmak a keresést a Reactome adatbázisra leszűkítve.

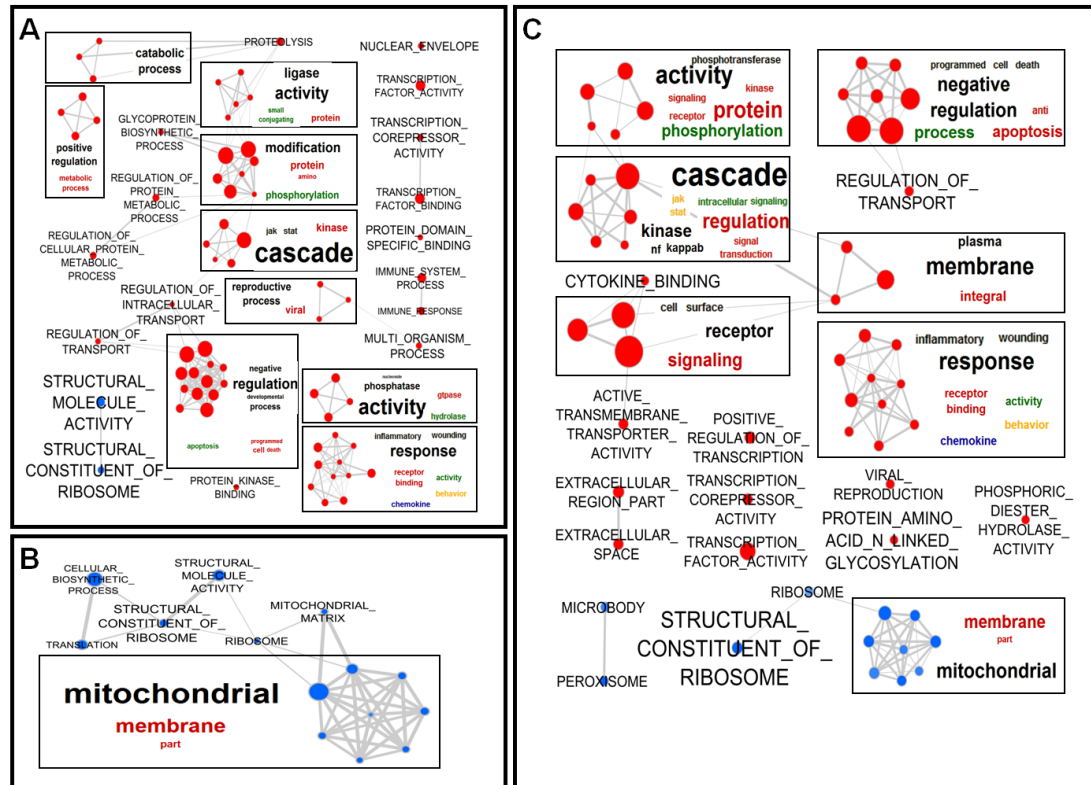
NetID	NES	Folyamat neve
1. 2290	1.84	Growth hormone receptor signaling
2. 1069	1.79	Transferrin endocytosis and recycling
3. 2473	1.77	Chemokine receptors bind chemokines
4. 2665	1.74	Signaling by insulin receptor
5. 1546	1.68	NOD1/2 signaling
6. 2367	1.67	Iron uptake and transport
7. 2408	1.64	NOD like receptor signaling pathways
8. 1775	1.6	Activation of genes by ATF4
9. 1207	1.6	Latent M. tuberculosis infection
10. 2145	1.58	PERK regulates gene expression
11. 2043	1.52	G alpha (i) signaling events
12. 1163	1.52	G2/M checkpoints
13. 2205	1.5	Activation of ATR in response to replication stress
14. 2136	1.48	Downregulation of SMAD2/3-4 transcriptional activity
15. 1724	1.47	Class A1 rhodopsin-like receptors
16. 1505	1.47	Regulation of HIF by oxygen
17. 1206	1.46	Sphingolipid metabolism
18. 1553	1.45	Signaling by Interleukins
19. 2658	1.43	Meiosis
20. 2232	1.41	Innate immune system

NetID	NES	Folyamat neve
1. 1292	-2.21	Peptide chain elongation
2. 1573	-2.19	3-UTR mediated translational regulation
3. 2595	-2.16	Respiratory electron transport
4. 1674	-2.15	Respiratory electron transport (ATP synthesis)
5. 2371	-2.04	SRP-dependent cotranslational targeting to membrane
6. 1821	-2.02	Influenza viral RNA transcription and replication
7. 1736	-2.02	Translation
8. 1401	-1.99	TCA cycle and respiratory electron transport
9. 1131	-1.93	Nonsense mediated decay enhanced by the exon junction complex
10. 1743	-1.91	Cell junction organization
11. 2662	-1.82	Mitochondrial protein import
12. 1951	-1.72	Cell-cell communication
13. 1908	-1.69	Influenza life cycle
14. 1045	-1.64	Semaforin interactions
15. 2302	-1.63	Metabolism of proteins
16. 1657	-1.62	tRNA aminoacylation
17. 1905	-1.47	Immunoregulatory interactions between a lymphoid and a non-lymphoid cell
18. 1992	-1.4	Metabolism of RNA



19. ábra: Az EVk jelenlétében legnagyobb változást mutató géncsoportok a Reactome fogalomtérképén ábrázolva. A csomópontok színe a változás irányát jelöli (piros pozitív, kék negatív dúsulás). A csomópontok felirata megfelel az előző táblázat (3. táblázat) NetID azonosítóinak.

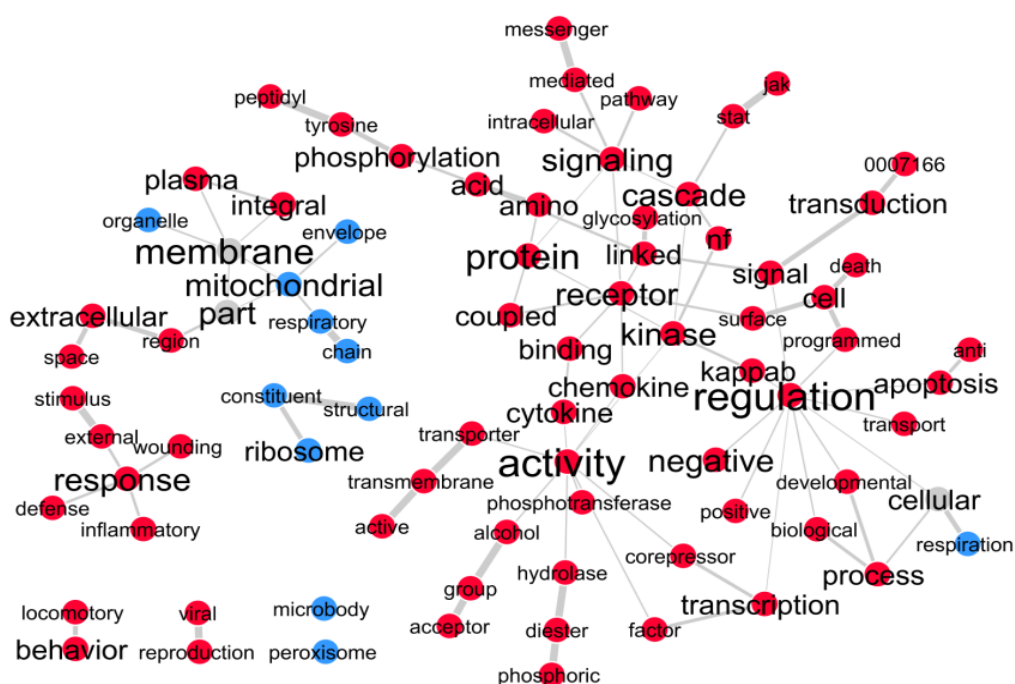
A MSigDB adatbázis teljes c5 részében található, biológiailag releváns fogalmak közötti redundancia enyhítése érdekében az eredményeink alapján valamely kísérleti tényező jelenlétében szignifikáns mértékben megváltozott fogalmak közötti átfedéseket az EnrichmentMap [446] szoftver segítségével ábrázoltuk, a sűrűn átfedő fogalmak feliratát pedig szófelhővel helyettesítettük (20. ábra). Ily módon mindhárom kísérleti elrendezés hatásait összehasonlítva látható, hogy az EVk jelenlétében elsősorban a riboszómák és a mitokondrium működésével kapcsolatos fogalmak dúsulása figyelhető meg. A TNF kezelés hatására megváltozott kifejeződést mutató gének ezzel szemben több, jól ismert biológiai folyamatot (például foszforilációs kaszkádokat, apoptózist és a gyulladásos választ) befolyásoltak, elsősorban pozitív irányban.



20. ábra: A szignifikáns dúsulást mutató, biológiai folyamatokkal kapcsolatos géncsoportok. A TNF (A), az EVk (B) és a két tényező együttes jelenléte (C) esetén megfigyelt génkifejeződés alapján a piros szín dúsulást, a kék pedig a hanyagolást jelent. A sok génben átfedő és ez alapján vélhetően szorosan összetartozó fogalmak csoportjait szófelhőkkel helyettesítettük, ahol a szavak egyedi mérete az előfordulás gyakoriságával arányos [387].

Az EVk és a TNF együttes jelenlétének hatására bekövetkező génkifejeződésbeli változások által érintett biológiai folyamatokból szófelhőket készítettünk ott, ahol több, a gének szempontjából átfedést mutató folyamat is érintett volt. A szófelhőt helyettesíthetjük egy gráffal is, ahol az együttesen előforduló szavak egy éllel vannak összekötve, az él vastagsága az együttes előfordulás gyakoriságára, a csomópontok felíratának mérete pedig a szó előfordulásának gyakoriságára utal. Azonnal látszik, hogy a legközpontibb funkciók szabályozással, jelátvitellel, receptoraktivitással és a gyulladásos válasszal kapcsolatosak és elsősorban dúsulást mutatnak a kontrollhoz képest (21. ábra).

A jelátviteli folyamatok jelentőségére utal a „signaling”, „receptor”, „cascade”, „kinase”, „phosphorylation”, „regulation” és „response” szavak ismételt előfordulása. A két tényező együttes jelenléte szintén befolyásolja a már említett NFκB jelátvitelt és az apoptózis folyamatát is. Fokozódik ezen túl a gyulladásos válaszban, a sejtek helyzetváltoztató mozgásában és a fehérjeszintézisben érintett gének kifejeződése. Az EVk és a TNF együttes jelenléte csökkenti ugyanakkor a mitokondriummal és sejtlegzéssel kapcsolatos gének átíródását.



21. ábra: EVk és TNF együttes hatása által befolyásolt biológiai folyamatokból készült fogalmi hálózat. Az együttesen előforduló szavak közötti él vastagsága az együttes előfordulás gyakoriságával, a csomópontok feliratának mérete pedig a szó előfordulásának gyakoriságával arányos. A piros szín pozitív, a kék negatív dúsulást jelent [387].

Hogy az elsősorban az EVk és a TNF együttes jelenléte által befolyásolt biológiai folyamatokat is azonosíthassuk, a két tényező együttes jelenlétében megfigyelt génkifejeződést a TNF jelenlétében tapasztaltakkal is összehasonlítottuk a GSEA módszer segítségével. Ekkor azt találtuk, hogy két tényező együttes jelenlétében a TNF egyedüli jelenlétéhez képest jobban megváltozott az NFκB kaszkádoz, sejtfelszíni receptorokhoz, receptorok jelátviteléhez, valamint az N-glikozilációban szerepet játszó enzimekhez köthető gének kifejeződése.

Hogy az ezen folyamatok megváltozásában központi szerepet betöltő géneket azonosíthassuk, a két kísérleti elrendezést összehasonlítva a legnagyobb transzkripció különbségeket mutató 60 gén kapcsolatrendszerét is feltüntettük (22. ábra). Ennek a hálózatnak a legtöbb kapcsolattal rendelkező elemei membránhoz köthető fehérjéket és a G-fehérje-kapcsolt jelátvitel fehérjéit (nem csak receptorokat) kódoló gének, melyek közül kiemelkednek egyes citokinek, mint az IL-8, a CCL2, CCL3, CCL4 és a CXCL10.

81

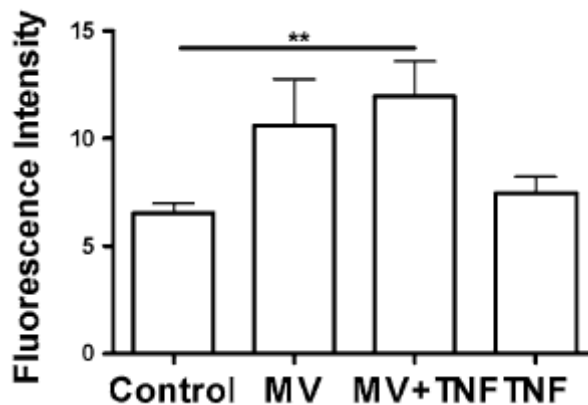
Ennek a torzításnak a kiküszöbölésére a MSigDB adatbázis azon szekciójából is kerestünk az általunk megfigyeltékhez hasonló génexpressziós mintázatokat, mely a szakirodalomban eddig leírt, a legkülönbözőbb kísérleti elrendezésekben megfigyelhető génkifejeződésbeli változásokat gyűjti össze. Ezek közül a szakirodalomban közölt mintázatok közül a Gargalovic és munkatársai által [449] oxidált foszfolipidek jelenlétében leírtak hasonlítottak legjobban a kísérleti eredményeinkből kiolvasható transzkripciós változásokhoz (4. táblázat).

4. táblázat: A szakirodalomban közölt génexpressziós mintázatok, melyek hasonlóságot mutatnak az EVk jelenlétében megfigyelhető változásokkal

	Gén ontológia (biológiai folyamat)	A génpanel mérete (db)	Dúsulási pontszám	Normalizál t pontszám	Nominális p érték	FDR q érték
1.	GARGALOVIC_RESPONSE_TO_OXIDIZED_PHOSPHOLIPIDS_BLUE_UP	80	0,64	2,38	0,000	0,232
2.	CHEN_HOXA5_TARGETS_9HR_UP	142	0,53	2,18	0,000	0,124
3.	GENTILE_UV_RESPONSE_CLUSTER_D5	26	0,7	2,15	0,000	0,284
4.	UDAYAKUMAR_MEDI1_TARGETS_DN	147	0,5	2,08	0,003	0,406
5.	BRACHAT_RESPONSE_TO_CAMPTOTHECIN_UP	18	0,73	2,05	0,005	0,378
6.	GARGALOVIC_RESPONSE_TO_OXIDIZED_PHOSPHOLIPIDS_TURQUOISE_UP	43	0,6	2,05	0,005	0,393
7.	LINDSTEDT_DENDRITIC_CELL_MATURATION_B	41	0,6	1,99	0,014	0,357
8.	ZWANG_CLASS_3_TRANSIENTLY_INDUCED_BY_EGF	104	0,49	1,97	0,017	0,338
9.	TURASHVILI_BREAST_LOBULAR_CARCINOMA_VS_DUCTAL_NORMAL_UP	21	0,68	1,96	0,017	0,347
10.	PRAMOONJAGO_SOX4_TARGETS_UP	35	0,6	1,95	0,017	0,319

4.3.3 Az MVk hatása az U937 sejtek kemoattraktáns potenciáljára

A génkifejeződés megváltozása alapján levont következtetések egyik legkonzekvensebb eleme a gyulladásos válasz, az ehhez köthető kemokinek (például az IL-8 és a sejtek helyzetváltoztató mozgásának (kemotaxisnak) a fokozódása volt EVk és TNF együttes jelenlétében. Ennek alátámasztására THP-1 humán monocita sejtvonal sejtjeinek kemotaktikus válaszkészségét vizsgáltuk az U937 sejtek sejt felülűszojának jelenlétében.

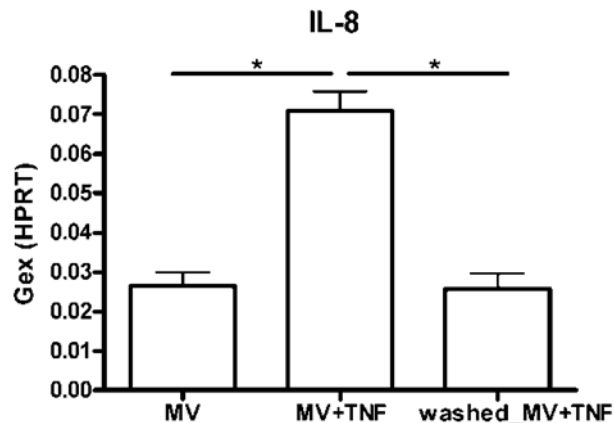


23. ábra: Az U937 sejtek kemoattraktáns képességének fokozódása MVk és TNF együttes jelenlétében. THP-1 monocita sejtvonal sejtjeinek kemotaktikus válaszát vizsgáltuk Boyden kamra segítségével, előzetesen izolált MVk, TNF, vagy a TNF és a MVk együttes jelenlétében tenyésztett U937 monocita sejtvonal kondicionált felülűszoja hatására. A szignifikáns különbséget csillag jelöli [387].

Kísérleti adataink arra utalnak, hogy bár önmagában is tendenciózan fokozta a kemotaktikus válaszkészséget a MVk jelenléte, a kontrollhoz képest szignifikánsan nagyobb sejt migrációt azonban csak akkor voltak képesek kiváltani az U937 sejtek, ha előzőleg MVk és TNF együttes jelenlétében tenyésztettük őket (23. ábra).

4.4 Az EVk által a kísérleti rendszerünkben előidézett változásokért felelőssé tehető mechanizmusok felderítése

4.4.1 A MVk felszíne és a TNF között kialakuló fizikai kapcsolat lehetőségének kizárása

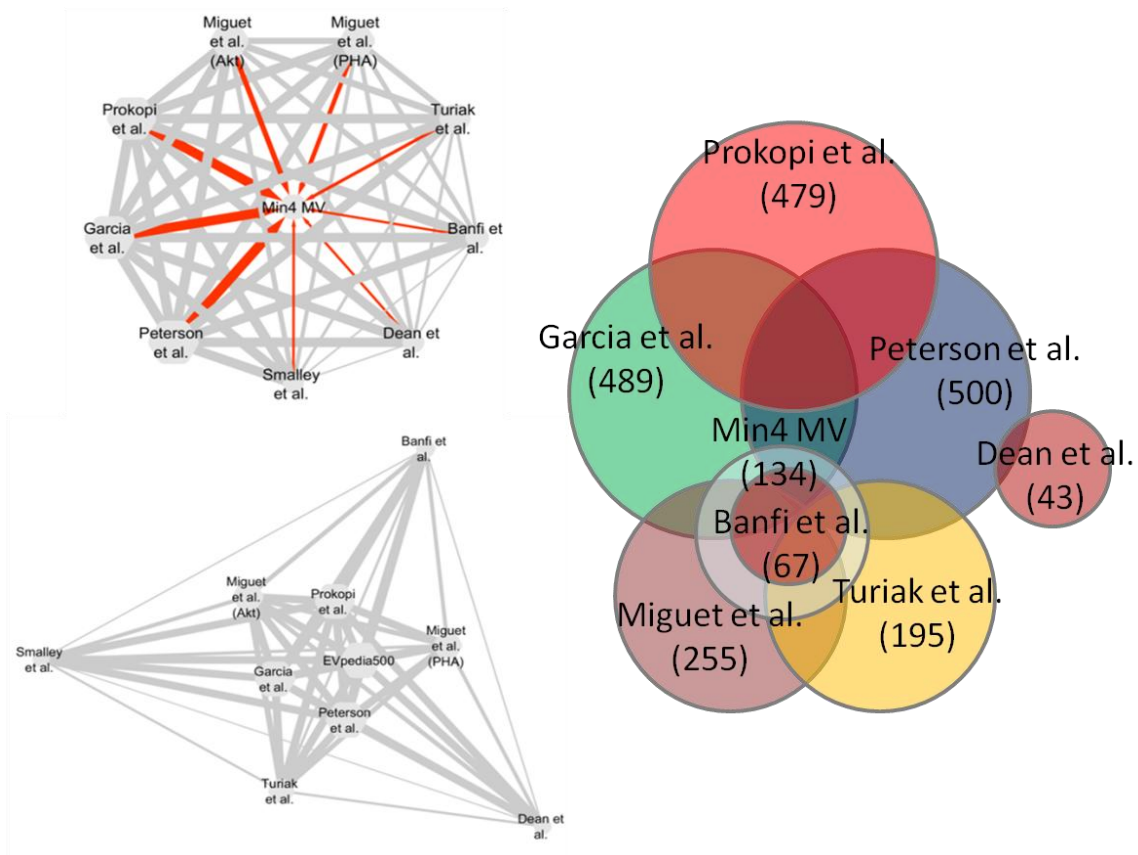


24. ábra: A MVk felszínéhez kötődő TNF szerepének kizárása az oldott állapotú TNF eltávolítása révén. Az izolált MVk felszínét rekomináns TNF citokint tartalmazó oldat jelenlétében telítettük a citokinnel, majd a nem kötődő citokint mosással eltávolítottuk („washed MV”), és ennek TNF citokinnel egyidejű hatását hasonlítottuk a nem telített MVk és TNF egyidejű hatásához. Az IL-8 gén HPRT génre vetített relatív génexpressziós értékek (Gex(HPRT)) közötti statisztikailag szignifikáns eltéréseket és a szignifikanciaszinteket csillagok jelölik (qRT-PCR) [387].

Az izolált MVk és TNF együttes jelenlétében megfigyelt hatás hátterében felmerült annak lehetősége, hogy a TNF jelenlétében módosultak a MVk például azáltal, hogy felszínükhöz kötődött a TNF. Ha azonban 10 ng/mL TNF-nek az MV-preparátumhoz való hozzáadása után az MV frakciót ismét kiülepítettük és az oldatban maradt TNF-et eltávolítottuk (de a MVk felszínéhez erősen kötődöttet nem), akkor a tiszta MV-preparátumhoz hasonló hatást láthattunk (24. ábra). Mind az izolált MVk, mind pedig az ilyen módon kezelt MV-preparátum hatásához képest csak MV-k és TNF együttes jelenlétében figyelhettünk meg az IL-8 génjének szignifikáns módon fokozott átíródását.

4.4.2 Az MVk által szállított fehérjék azonosítása a szakirodalom elemzése alapján

Mivel eredményeink arra utaltak, hogy kísérleti rendszerünkben az EVk közül leginkább MVk jelenlétére kell számítani, az EVpedia adatbázisban viszont több más EV típus vizsgálata során nyert adat is található, a szakirodalom elemzése alapján igyekeztünk a MV populációra specifikus információt nyerni. Ennek érdekében a MVk által szállított fehérjéket nagy áteresztőképességű módszerrel (például tömegspektrométerrel) vizsgáló tanulmányok alapján állítottuk össze a MVk részeként várhatóan megjelenő fehérjék listáját.



25. ábra: Az MVk fehérjetartalmát leíró közlemények eredményei közötti megfelelés. Az átfedés mértéke arányos a nyilak vastagságával, illetve a körök átfedő területével.

Az EVk izolálásának módszertana alapján nyolc olyan közleményt találtunk a szakirodalomban, melyekben mai ismereteink szerint a vizsgált mintákban valóban elsősorban MVk előfordulására lehetett számítani [48, 51, 450–455]. Ezek közül Peterson és munkatársai [454], Prokopi és munkatársai [450], valamint Garcia és

munkatársai [451] által közölt adatsorok tartalmazzák a legtöbb fehérjét, míg Miguét és munkatársai [455] éppen abból a CCRF-CEM T-setjes sejtvonalból származó MVk fehérjetartalmát vizsgálta, melyeket mi is felhasználtunk kísérleteink során az EVk forrásául.

Az egyes tanulmányok eredményei között csupán kisebb átfedéseket sikerült kimutatni (25. ábra), míg az adatsorok átlagosan felerészben olyan fehérjéket tartalmaztak, melyeket más vizsgálatok nem írtak le a MVk részeként. Mintegy 134 olyan fehérjét sikerült azonban azonosítani, amelyek legalább négy adatsorban szerepelnek (Miguét és munkatársai két kísérleti elrendezésben is vizsgálták a MVk összetételét).

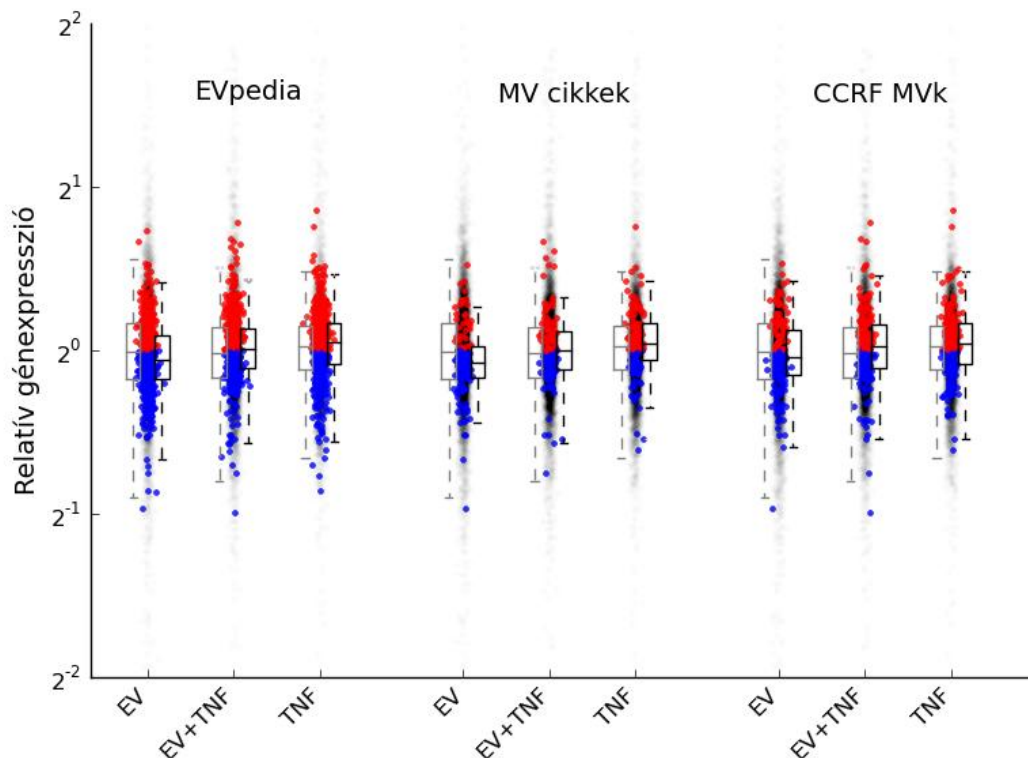
Ha tanulmányonként nézzük, akkor 169 olyan fehérjét találtunk, amelyeket legalább három közlemény kimutatott. A GO PANTHER elemzése alapján ezek 69%-a rendelkezik katalitikus aktivitással – ezen belül például jelen vannak oxidoreduktázok, hidrolázok, transzferázok. Számos struktúrfehérje (a második legnagyobb csoport 12%-os részesedéssel) és elsősorban citoszkeletális fehérje is kimutatható a MVk részeként, valamint transzporterek, receptorok, antioxidáns hatású fehérjék, nukleinsavkötő fehérjék és chaperonok.

A funkcionális szempontból összetartozó fehérjecsoportok tagjai közül legnagyobb arányban az integrin jelátviteli útvonal tagjait és a citoszkeletonnal kapcsolatos szabályozóelemeket, a glikolízis enzimeit, a gyulladásos válaszban fontos citokineket (beleértve a kemokineket), a FGF jelátviteli útvonal elemeit, illetve Parkinson-kórban fontos fehérjéket sikerült kimutatni a MVk preparátumaiban. A MVk részét képezi számos membránfehérje (7%), de a fehérjéknek egy része eleve ismert módon az extracelluláris térben fordul elő (4%) vagy sejtszervecskék részét képezi (27%).

A MVk által szállított fehérjéket a Reactome adatbázis fogalomtérképére vetítve azt látjuk, hogy legnagyobb arányban (jellemzően 25-30%-ban) a vírusok élettanához, és az immunrendszerhez kötődő funkcionális csoportok tagjai között vannak jelen. A teljesség igénye nélkül felsorolva, az influenza vírus által kiváltott apoptózis, F osztályú scavenger receptorok funkciója, az endoplazmatikus retikulumban lezajló N-glikán-módosítás, és olyan metabolikus folyamatok, mint a glikolízis és a β -oxidáció adódtak a legrelevánsabb biológiai folyamatoknak.

4.4.3 Az EVk, illetve MVk által szállított fehérjék lehetséges szerepe a kísérleti elrendezésünkben

Az EVpedia által nyilvántartott 500 leggyakoribb fehérje, a MVk irodalmi adatok összevetése alapján összeállított fehérjekészlete, és az általunk is használt, CCRF sejtvonalra specifikus adatsor (Miguet et al. alapján) között kielégítő mértékű átfedést látunk, de egyik adatsor esetében sem észlelhető az oda tartozó gének jelentősen megváltozott expressziója valamely kísérleti elrendezésben (26. ábra).



26. ábra: Az egyes adatsorok alapján EVk fehérjekészletét kódoló gének kifejeződése különböző kísérleti elrendezésekben. Sötét pontok és szürke boxplot jelölik az összes gén mérési eredményét magába foglaló háttér, míg színes pontok (pirossal a pozitív, kékkel a negatív változások) és fekete boxplot jelölik az adott kategóriába eső génekhez tartozó próbák esetében mért értékeket [387].

A közvetlenül az EVk által szállított fehérjék génjeit érintő expressziós változásoknál relevánsabb eredménnyel kecsegtet a vezikuláris fehérjék interakciós partnereinek vizsgálata annál is inkább, mivel a GO adatbázis fogalmai alapján is kiemelt jelentőségűnek adódtak a fehérje-fehérje kapcsolatok.

Ennek vizsgálatára első megközelítésben a Reactome adatbázis szabályozási információit használtuk fel. Mivel az adatbázis gátló és stimuláló kapcsolatokat is megkülönböztet, a kettő aránya alapján igyekeztünk megbecsülni, hogy mely biológiai folyamatokra fejthetnek ki hatást az EVk, amennyiben az általunk összeállított fehérjekészletekkel rendelkeznek.

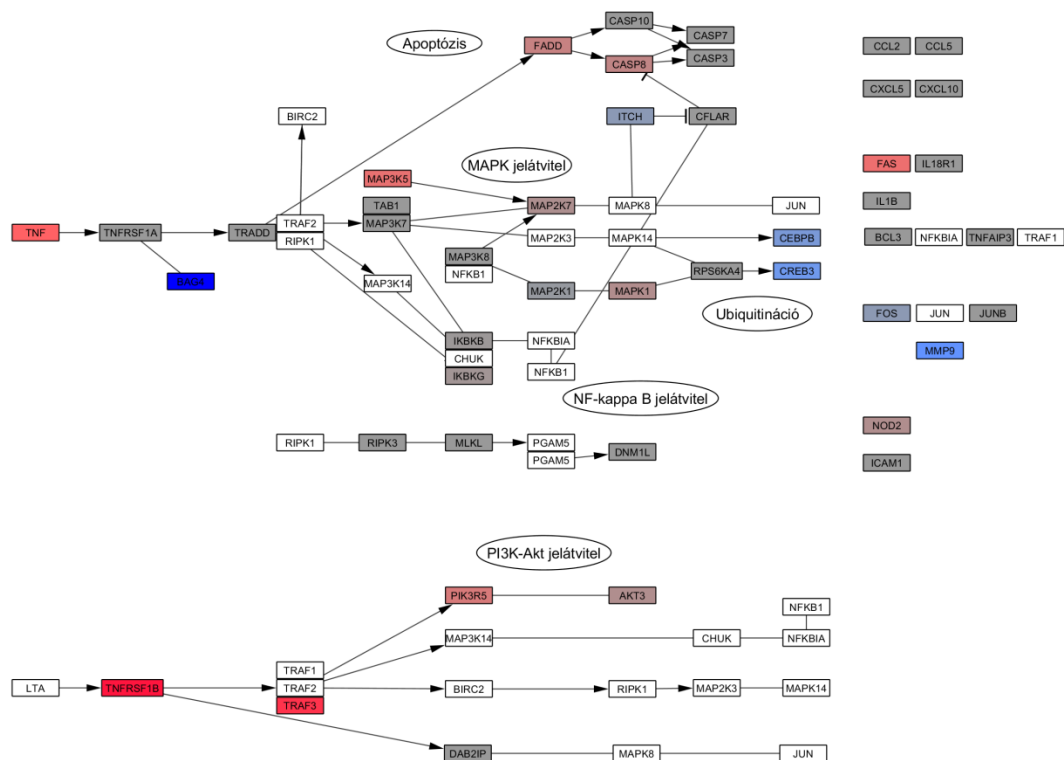
5. táblázat: Az EVpedia adatbázisában nyilvántartott fehérjék által potenciálisan befolyásolt biológiai folyamatok Az egyes fogalmakhoz tartozó összes gén gátló és stimuláló kapcsolatai arányának különbségét jelöljük, negatív százalékos érték az egyensúly gátló irányú eltolódására utal.

NetID		Folyamat neve	
1.	1176	100%	Trafficking of myristoylated proteins to the cilium
2.	1648	60%	Sperm:Oocyte Membrane Binding
3.	1202	50%	Synthesis of PIPs at the ER membrane
4.	1587	47%	Deletions in the AMER1 gene destabilize the destruction complex
5.	1154	46%	XAV939 inhibits tankyrase, stabilizing AXIN
6.	1835	41%	Toxicity of tetanus toxin (TeNT)
7.	1308	40%	Acyl chain remodelling of PG
8.	1087	40%	TNF receptor superfamily (TNFSF) members mediating non-canonical NF-kB pathway
9.	2130	40%	Mitotic Metaphase/Anaphase Transition
10.	2087	37%	Minus-strand DNA synthesis
11.	1810	37%	Uncoating of the HIV Virion
12.	1808	37%	Reverse Transcription of HIV RNA
13.	1673	37%	Plus-strand DNA synthesis
14.	2301	36%	Inhibition of the proteolytic activity of APC/C required for the onset of anaphase
15.	2166	36%	Inactivation of APC/C via direct inhibition of the APC/C complex
16.	2080	35%	Conversion from APC/C:Cdc20 to APC/C:Cdh1 in late anaphase
17.	2561	34%	APC truncation mutants are not K63 polyubiquitinated
18.	1093	32%	Deletions in the AXIN genes in hepatocellular carcinoma result in elevated WNT signaling
19.	2556	31%	Virus Assembly and Release
20.	1146	31%	Assembly of Viral Components at the Budding Site

NetID		Folyamat neve	
1.	2230	-100%	Collagen biosynthesis and modifying enzymes
2.	1755	-100%	Terminal pathway of complement
3.	1322	-100%	Anchoring fibril formation
4.	1270	-100%	Crosslinking of collagen fibrils
5.	1685	-84%	Classical Kir channels
6.	1767	-60%	Eicosanoid ligand-binding receptors
7.	1766	-60%	Prostanoid ligand receptors
8.	2690	-50%	Entry of Influenza Virion into Host Cell via Endocytosis
9.	2287	-50%	Binding and entry of HIV virion
10.	1605	-50%	Activation, translocation and oligomerization of BAX
11.	1484	-42%	Regulation of cytoskeletal remodeling and cell spreading by IPP complex components
12.	1451	-38%	BH3-only proteins associate with and inactivate anti-apoptotic BCL-2 members
13.	1215	-35%	Adherens junctions interactions
14.	1739	-33%	Deadenylation-dependent mRNA decay
15.	1494	-33%	Deadenylation of mRNA
16.	1609	-31%	RHO GTPases activate IQGAPs
17.	1261	-29%	Regulation of Insulin-like Growth Factor (IGF) transport
18.	1743	-26%	Cell-cell junction organization
19.	1580	-25%	Unblocking of NMDA receptor, glutamate binding and activation
20.	1164	-25%	Inhibition of PKR
21.	1577	-24%	CREB phosphorylation through the activation of CaMKII
22.	2672	-24%	SALM protein interactions at the synapse

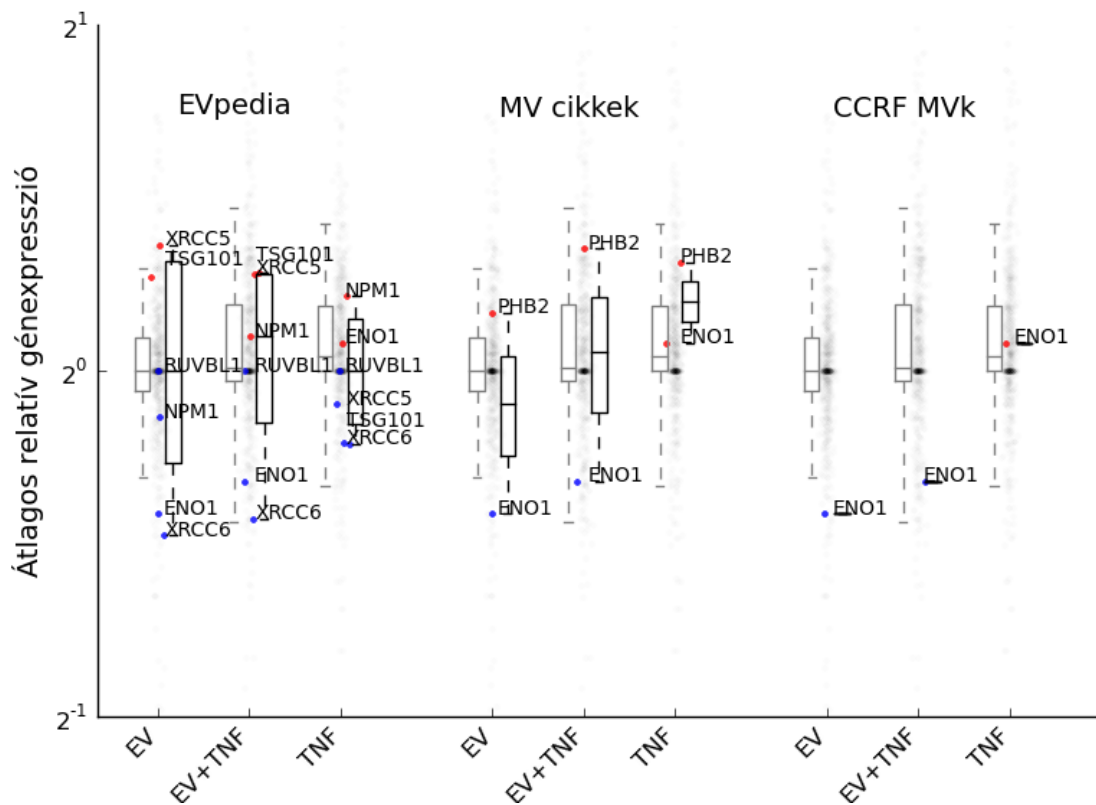
Az EVpedia adatai alapján az EVk fehérjekészlete alkalmas lehet arra, hogy befolyásolja a metabolizmust, a jelátvitelt, az immunrendszert vagy egyes fertőzéshez (és különösen vírusfertőzéshez) köthető folyamatokat (5. táblázat). A szűkebb listák alapján képzett fehérjekészletek esetében azonban már alig mutatható ki ilyen hatás. Kivéve a vírusfertőzéshez köthető fogalmakat, melyek mind a MV fehérjék, mind pedig a CCRF MVk fehérjei számára feltűnően sok interakciós partnert biztosítanak.

Amennyiben kifejezetten a TNF jelátviteli útvonalának KEGG adatbázisban nyilvántartott tagjaira várhatóan kifejtett hatást vesszük figyelembe, látható, hogy az EVk feltehetően nem egyforma mértékben képesek a TNF két receptoráról elinduló jelátviteli útvonalakat fokozni: a TNFR2 által közvetített jelátvitelre nagyobb mértékben vannak hatással az EVk által szállított fehérjék (27. ábra).



27. ábra: Az EVk által szállított fehérjék gátló és stimuláló kölcsönhatásainak eredője a TNF jelátviteli útvonal egyes elemein. Az egyes gének összes gén gátló és stimuláló kapcsolatai arányának különbsége alapján. A piros szín stimuláció, a kék szín gátlás irányába történő eltolódást jelez.

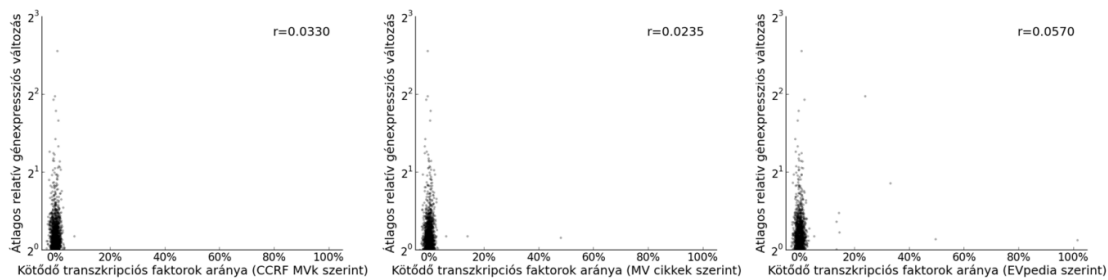
A MVk és a CCRF MVk által szállított fehérjekészlet és a TNF jelátvitelének útvonala között csak elhanyagolható mértékű direkt kölcsönhatást sikerült kimutatni. Hasonlóan kevés olyan fehérjét sikerült azonosítani, amelyek valamely EV típus fehérjekészletébe tartoznak, és egyszersmind a TNF jelátviteli útjának tagjai is. A MV fehérjék esetében a DNML1 jelenlétét erősítette meg három egymástól független tanulmány, míg egyszeri adat a CASP3, a MAPK1, valamint a TNF által befolyásolt CCL5, ICAM1 és MMP14 gének termékeiről szerepel a bevont tanulmányokban. A fehérje-fehérje interakciók szerepének egzakt összevetésére a mérési eredményeinkkel csak igen korlátozottan nyílik mód. A génszabályozási interakciók esetében azonban van lehetőség arra, hogy az EVk által szállított fehérjék várható hatását összehasonlítsuk a mért génexpressziós változásokkal.



28. ábra: Az EVk által szállított fehérjék interakciós partnereinek átlagos relatív génexpressziója. Sötét pontok és szürke boxplot jelölik a TRRUST adatbázis összes bejegyzésének átlagos értékeit magába foglaló háttér, míg színes pontok (pirossal a pozitív, kékkel a negatív változások) és fekete boxplot jelölik az adott adatsor alapján vezikulárisnak tartott génregulatorikus fehérje interakciós partnerei relatív génexpressziójának mértani közepét EVk jelenlétében.

Az egyik ilyen lehetőség a GSEA elemzés során transzkripciós faktorok kötőhelyeinek keresése, mely megközelítés csak korlátozott eredménnyel járt. Egy másik megközelítés szerint a vezikuláris fehérjék RegNetwork és a TRRUST adatbázisokban nyilvántartott génregulációs kapcsolatait összegeztük. Azt kerestük, hogy az összes, az adatbázis szerint szabályozott gén EVk jelenlétében mért relatív génexpressziós értékeinek mértani közepe hogyan alakul. A két adatbázis vizsgálata során igen hasonló eredményeket kaptunk (a RegNetwork bővebb, de talán kicsit zajosabb adatsort tartalmaz), melyek közül kiemelkedik a TSG101, az enoláz fehérje és a Ku autoantigénkomplex tagjainak (XRCC5-6) relevanciája (28. ábra).

Amennyiben a vezikuláris fehérjék valóban jelentős mértékben hozzájárult az EVk jelenlétében mérhető változásokhoz, akkor feltételezésünk alapján minél erősebb interakciós partnerei átlagosan a szabályozott géneknek (azaz minél kevesebb másik szabályozó elemmel kell osztotnia a célpontján), annál nagyobb mértékű változást kell látnunk, a két érték között pozitív korrelációt várunk. Ezt azonban mérési adataink alapján egyik adatsor esetében sem sikerült igazolnunk (29. ábra).

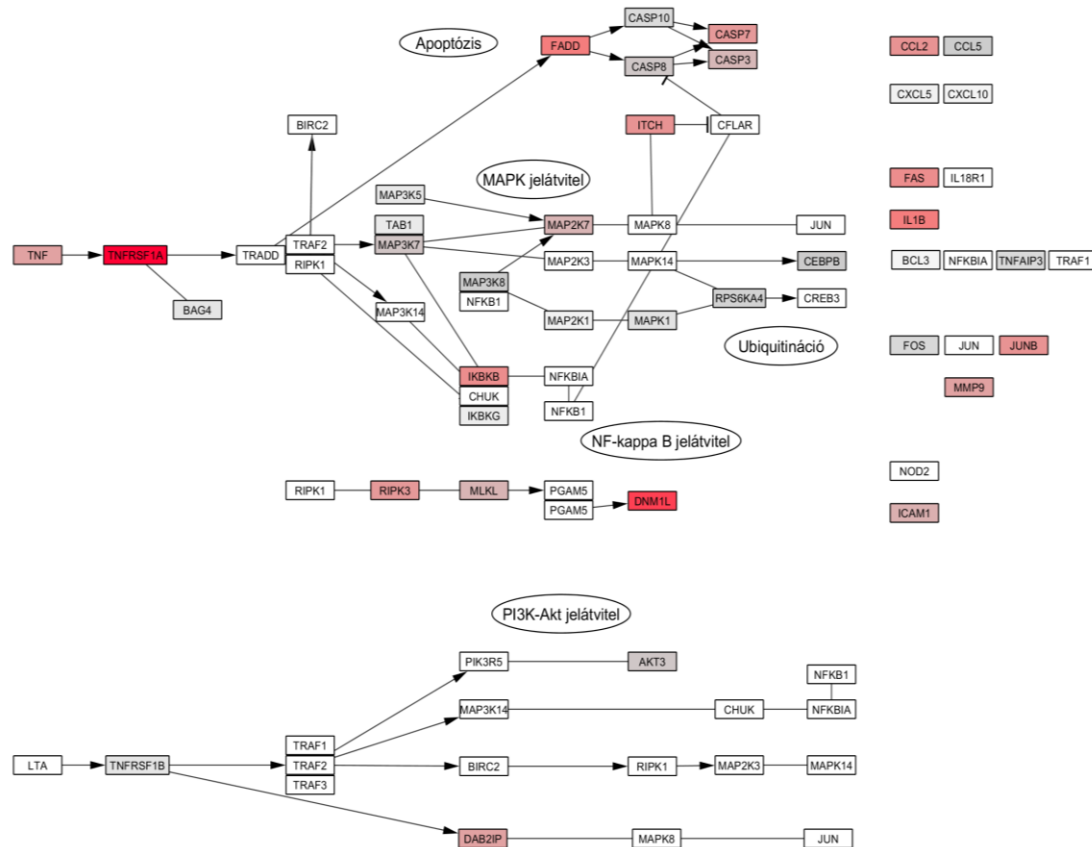


29. ábra: Az egyes gének EVk jelenlétében megfigyelt kifejeződése és a kötődő transzkripciós faktorok között megtalálható vezikuláris fehérjék aránya közötti korreláció. Spearman-féle korrelációs koefficiens.

4.4.4 Az EVk által szállított miRNS molekulák lehetséges szerepének vizsgálata az EVk és a TNF közötti kölcsönhatás hátterében

A sejtek génregulációs hálózatának nemcsak transzkripciós faktorok, hanem miRNS molekulák is tagjai, melyeket szintén képesek az EVk célba juttatni. Az EVk jelenlétében ráadásul több gén átíródása is csökkenést mutatott, ami szintén felvetette annak lehetőségét, hogy a megfigyelt hatások hátterében miRNS molekulák állhatnak. Az EVpedia adatbázis nyilvántartása alapján EVk belsejében kimutatott miRNS-ek kapcsolatait feltérképezve a Reactome adatbázis fogalmi hálózatán elmondható, hogy

több mint 200 fogalmi kategória van, ahol a gének 95%-át képes EVk által szállított miRNS szabályozni. Ennek megfelelően várható módon a KEGG által nyilvántartott TNF jelátviteli útvonalon szereplő fehérjék génjeinek átírását is képesek olyan miRNS molekulák befolyásolni, melyeket EV belsejében is kimutattak (30. ábra).



30. ábra: Az EVk belsejében kimutatott miRNS molekulák ismert kötődése a TNF jelátviteli útvonal tagjait kódoló génekhez. Piros szín jelöli azokat a fehérjéket, amelyeket több mint 75%-ban EV által szállított miRNS-ek szabályozhatnak; az ezalatti értékekhez szürke árnyalatok tartoznak.

Mivel egyrészt ez a rendkívül szerteágazó hatás nem cseng össze megfigyeléseinkkel, másrészt pedig a MVk belsejében nem szükségszerűen várhatjuk az összes, az EVk belsejében valaha leírt miRNS jelenlétét, igyekeztünk megkeresni a miRNS molekulák azon kis csoportját, amely megfigyeléseinket leginkább magyarázhatja. Ebben ismételtelen a GSEA módszer volt segítségünkre. A MSigDB v5.1 adatbázis c3 része által listázott modulok között kerestük azokat, melyek alapján feltételezhető lenne, hogy az EVk jelenlétében valamely transzkripció faktor vagy

miRNS által befolyásolt géncsoport kifejeződése változott meg **Hiba! A hivatkozási forrás nem található..**

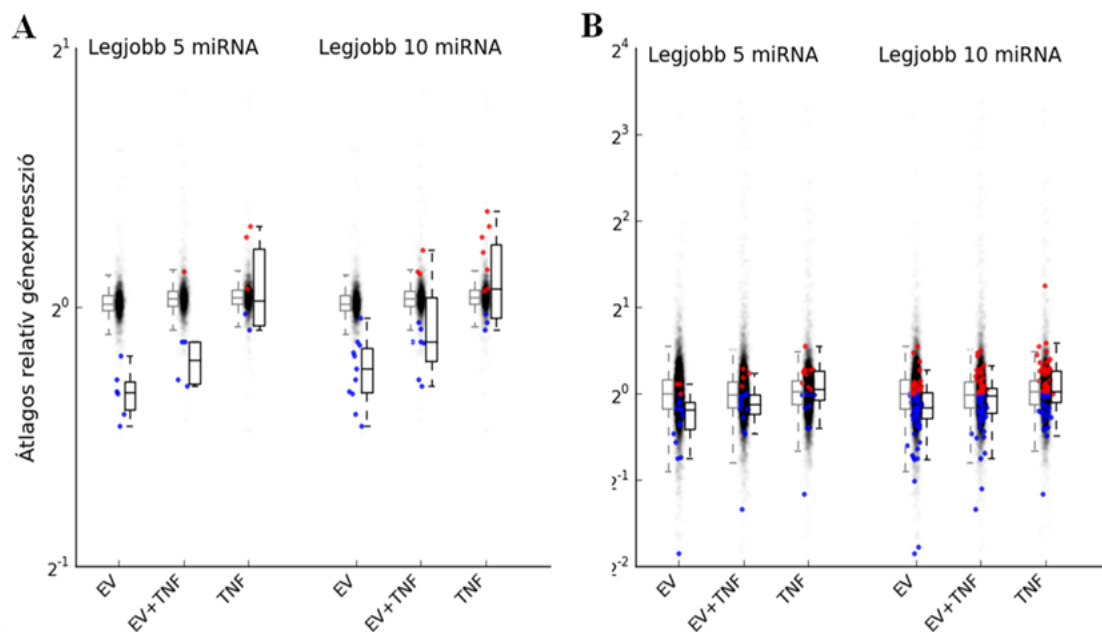
A legrelevánsabb tíz géncsoport között találjuk a hsa-miR-142-3p, hsa-miR-530d, hsa-miR299-5p, hsa-miR-30-3p, hsa-miR-486 és hsa-miR-128 miRNS molekulák által szabályozott géneket. A transzkripció faktorok között ugyanebben az elemzésben a SREBP1 fehérje szerepe merült fel az EVk jelenlétében megfigyelt génkifejeződés hátterében. Két olyan motívum is felfedezhető továbbá azoknak a géneknek a szabályozó régiójában, melyek átíródása EVk jelenlétében a kontrollhoz képest megváltozott, melyekhez mai ismereteink alapján még nem tudunk konkrét transzkripció faktort rendelni.

Másik megközelítéssel az EVk jelenlétében szignifikáns mértékben csökkent kifejeződést mutató géneket befolyásoló miRNS molekulákat a miRWalk 2.0 [426, 427] szoftver segítségével igyekeztünk azonosítani. A 39 érintett gén és lókuszt közül 29 szerepelt az adatbázisban, mint validált miRNS célpont. Az ezekre a génekre 494 különböző miRNS molekula hathat kísérletesen igazolt módon. A miRNS molekulák többségének hatását azonban csupán egy-egy génhez lehetett kötni.

A legtöbb kapcsolattal a hsa-miR-26b-5p, a hsa-miR-484, a hsa-miR-92a-3p és a hsa-miR-16-5p rendelkeznek (5, illetve 4 szabályozott gén), valamint további 7 miRNS molekulát lehet 3-3 génnel kapcsolatba hozni. Ezek a 3 kapcsolattal rendelkező miRNS molekulák a hsa-miR-let7b-5p, hsa-miR-615-3p, hsa-miR-4668-5p, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-375, hsa-miR-215-5p és hsa-miR-142-3p. A két, elsőként említett miRNS önmagában képes az adatbázisban szereplő 29 gén közül 9 kifejeződését szabályozni. A 4 legfontosabb miRNS pedig 14 génnel hozható összefüggésbe. A további 7 miRNS már csak 8 újabb gént ér el.

Mivel egy génhez jellemzően több miRNS is képes kötődni, logikus lenne az a feltevés, hogy minél több olyan miRNS kötődik az adott génekhez, melyeket EVk szállítanak, EVk jelenlétében azok expressziója annál inkább csökken. Ilyen jellegű korrelációt azonban – a transzkripció faktorokhoz hasonlóan – nem sikerült kimutatni sem az EVpedia által nyilvántartott miRNS-k, sem a GSEA módszerrel nyert miRNS halmaz, sem pedig a miRWalk eredményei alapján releváns miRNS molekulák és a mérési eredményeink között.

Az egyes miRNS molekulák által szabályozott gének relatív expresszióinak középértékeit vizsgálva azonosítható néhány olyan miRNS, melyek megfelelnek ennek az elvárásnak (31. ábra), melyek közül a legjobban megfelelő értékekkel a hsa-miR-3676-3p, hsa-miR-1287-3p, hsa-miR-431-3p, hsa-miR-147b, hsa-miR-6829-5p és a hsa-miR-3620-5p rendelkeznek. Ezek közül a mi RNS molekulák közül azonban eddig még egyet sem azonosítottak EVk belsejében.



31. ábra: A mérési eredményeinkkel legjobb korrelációt mutató 5, illetve 10 miRNS által szabályozott gének relatív expressziója EVk jelenlétében. A) Az egyes miRNS (a nemzetközi elnevezéshez igazodva az ábrán miRNA) molekulákhoz tartozó gének relatív expresszióinak mértani középértékei. B) Az adott halmazokba tartozó miRNS molekulák által szabályozott egyes gének relatív expressziója.

5 Megbeszélés

5.1 Az intakt EVk forrásául kondicionált médiumot használó kísérleti rendszer értékelése

5.1.1 *A CCRF humán T-sejtes sejtvonal kondicionált sejtfelülszóját alkalmazó kísérleti rendszer felállításának indokai*

Az elmúlt fél évszázad során igen nagyszámú tanulmány vizsgálta egy-egy jelátviteli molekula hatását valamilyen *in vitro* kísérleti rendszerben. Többek között a citokinek hatásairól alkotott mai elképzeléseink is ilyen kísérletek eredményein alapulnak. Mintegy 15 évvel ezelőtt kezdett feltárulni egy teljesen új tudományterület, amely a mai napig az extracelluláris térben kolloid fázisban található, membránnal körülvett (tehát vezikuláknak tekinthető) struktúrák számos fiziológiás és patológias hatását igazolta. Ezek az eredmények szintén olyan *in vitro* kísérleti rendszerek megfigyelésén alapultak, ahol a jelátvivő struktúrák (jelen esetben EVk) izoláltan voltak jelen. Egy élő szervezet extracelluláris tereiben azonban egyszerre vannak jelen oldott fázisú jelátvivő molekulák (pl. citokinek) és kolloid fázisú struktúrák (minden bizonnyal az EVk több fajtája is). Ennek ellenére máig nem terjedt el olyan kísérleti rendszer vizsgálata, ahol a két tényező együttes hatásának megfigyelésére kerül sor. Ezen hiányosság pótlásához szerettünk volna hozzájárulni kutatásaink során a jelen tanulmányban leírt kísérleti rendszer felállításával.

Az EVk sejtekre gyakorolt hatásának vizsgálatára elterjedt módszer, hogy izolált EV-preparátumot adnak hozzá valamely sejtenyészet tenyésztőfolyadékához, és miután ilyen körülmények között nevelték a sejteket, valamely sejtválasz mérése alapján következtetnek az EVk hatására. Az EVk izolálására alkalmazott eljárások többsége nagysebességű centrifugálási és ultracentrifugálási lépéseket tartalmazó differenciál-centrifugálási módszer [35, 36, 314, 320, 329, 326, 328, 330, 331, 334, 456].

Fontos azonban igen körültekintően eljárni az ilyen kísérleti rendszerekből származó eredmények értékelésekor. Az egyik nagyon égető probléma az EV-preparátumok minőségellenőrzésének kérdése [316, 317, 320]. Míg az EV-preparátumban található EV típusok azonosításában segítségül hívhatjuk a jól bevált módszerek széles tárházát (pl. áramlási citometria, Coulter-elven vagy fényszórás-

mérésen alapuló módszerek), a vezikulák integritásának ellenőrzésére – hogy vajon nem sérült-e a lipidmembrán, illetve van-e egyáltalán vezikuláris struktúra a preparátumban – igen korlátozott és bizonytalan eredményekkel kecsegtető eszköztár áll rendelkezésre.

Az ultracentrifugálás során nemcsak a lipidmembrán sérülhet a nagy erőbehatások miatt, hanem az üledékben egymáshoz nagyon közel kerülő EVk aggregációjára is nagyobb esély van [414]. Ez egyrészt azért jelent komoly problémát, mert az izolálás után reszuszpendált üledékből készült minták több részre osztása után nem feltétlenül kerül egyforma mennyiségű EV az egyes mintákba, ami hozzájárulhat ahhoz, hogy az EVk hatásaival kapcsolatos eredmények nehezebben reprodukálhatók, mint az oldott állapotban lévő molekulára vonatkozóak. Másrészt egyáltalán nem biztos, hogy az EVk aggregátumának és az egyedi EVk biológiai hatása azonos lesz.

Ha csak azt emeljük ki, hogy az EVk aggregátumának összfelszíne jóval kisebb, mint az egyedi EVké, az EVk hatásainak egy részéért pedig nagy valószínűséggel membránfelszínük a felelős – mivel kötődési felszínt biztosítanak olyan felülethez kötött biológiai funkciók számára, mint például a véralvadás vagy az antigénprezentáció –, könnyen belátható, hogy az aggregáció miatt az ilyen EV-preparátumok felhasználásával kapott kísérleti eredmények nem a szervezetben lezajló élettani folyamatokat fogják tükrözni.

Szintén óvatosságra int az izolált EVk jelenlétében tapasztalt sejtválasz értékelése során annak lehetősége, hogy a nagysebességű centrifugálás során fehérjeaggregátumok is ülepednek az EVk mellett [271], és ezeknek a biológiai aktivitása is hozzájárulhat a megfigyelt hatáshoz. Ezek az aggregátumok ráadásul az üledékben szelektíven dúsulhatnak, és így az üledék hozzáadásával olyan struktúrákat adhatunk hozzá a sejtekhez, amelyek normális körülmények között csak nagyon kis mennyiségben lennének jelen az extracelluláris térben. Hasonlóképpen, az EVk koncentrációja sem feltétlenül fogja tükrözni a kezelt sejtek környezetében azokat a viszonyokat, amelyek a preparátum forrásaként szolgáló extracelluláris folyadékterben – legyen az például kondicionált médium, plazma vagy vizelet – uralkodtak. A leghatékonyabb izolálási módszerekkel sem lehet ugyanis az EVk teljes tömegét egy mintában üleptetni. Különböző módszerek eredményeként az EVk más-más típusait lehet jó hatékonysággal izolálni, míg a többi EV típus alul lesz reprezentálva mintánkban – akár a kimutathatóság határa alatt is.

Ezek a megfontolások vezettek bennünket arra, hogy kísérleteink során az EVk forrásaként szolgáló sejtmentes felülúszót további feldolgozás nélkül adjuk a recipiens sejtekhez, és az EVk hatását eredeti közegükben tanulmányozzuk. Mivel az EVk tanulmányozását célzó tudományterület rövid történetére való tekintettel még igen kevés és részben ellentmondásos adat áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy az egy-egy sejtípus vagy sejtvonal által termelt EVk milyen sejtelettani változást okoznak a recipiens sejteken, kísérleti rendszerünkben az U937 humán monocita sejtvonal sejtjeinek génátíródásában bekövetkező változásokat (mint egy általános, a környezeti hatásokra adott alkalmazkodási és válaszreakciót) kívántuk indikátorként használni.

5.1.2 A CCRF humán T-sejtes sejtvonal nyugvó sejtjei által kibocsátott EVk jellemzése

A CCRF humán T-sejtes sejtvonal felülúszójában 24 óra elteltével MVk jelenléte igazolható felszíni markereik, elektronmikroszkópos morfológiájuk és mérettartományuk alapján. Ezek mennyisége mind a Coulter-elv szerinti részecskeszámlálás, mind pedig az izolált preparátumok fehérjetartalmának mérése alapján a szakirodalomban sejtes válasz kiváltására alkalmazott EV mennyiségekkel összevethető [306]. A MVk mellett a sejtfelülúszóban minden bizonnyal egyéb EV típusok is jelen vannak. Vizsgálataink során apoptotikus testeket és exoszómákat is sikerült kimutatni, ám ezek jóval kisebb mennyiségben voltak jelen.

Az EVk és a TNF együttes jelenlétében megfigyelhető kölcsönhatás hátterében több tényező állhat. Kézenfekvő volt a feltételezés, hogy a CCRF sejtvonal kondicionált médiuma, az EVk, de akár az izolált MV-preparátum maga is tartalmazhatott TNF-et. Ebben az esetben az EVk esetében megfigyelt hatásért sem feltétlenül az EVk, hanem a velük együtt a sejtekhez adott citokin lenne a felelős. Ennek a lehetőségnek a kizárására a felhasznált minták TNF koncentrációját az ELISA módszerrel abban a hígításban mértük, amelyben a sejtekhez adtuk őket. Valóban sikerült is kimutatni TNF jelenlétét 10-15 pg/mL közötti koncentrációban, ez azonban elhanyagolható volt a kísérletben hozzáadott rekombináns TNF 10 ng/mL-es végkoncentrációjához képest. Mivel pedig a génkifejeződés globális vizsgálata során minden változást az EV-mentes felülúszóhoz hasonlítottunk – amely ugyanazokat a citokineket tartalmazta, mint az EV-tartalmú mintánk –, más citokinek torzító hatására sem számítottunk.

Végül a MVk felszínére is kötődhetett volna TNF, hiszen a MVk hordoznak TNF receptort és van irodalmi adat arra vonatkozóan, hogy ilyen módon juttatják célba a citokint [415]. Ebben az esetben, ha az MV-preparátumhoz TNF-et adunk, a felszíni kötőhelyek telítődhetnek, és a nem kötött TNF-et eltávolítva (vagy a MVk leüleptetésével) a TNF-tartalmú MVk preparátumából ELISA módszerrel nem feltétlenül lehet kimutatni a TNF jelenlétét – hiszen az nem szabadon, oldott állapotban lesz jelen. Az ily módon előkészített minta hatása viszont a TNF és a MVk együttes hatásához kell, hogy közelebb álljon, mint a MVk hatásához. Mivel kísérletünk során azt tapasztaltuk, hogy a MVk előzetes „dúsítása” a citokinnel nem reprodukálta a TNF és MVk együttes jelenlétének hatását, így ezt a lehetőséget is elvetettük.

5.2 Az EVk és a TNF génkifejeződésre gyakorolt hatásának összevetése

5.2.1 Az EVk és a TNF jelenlétében megfigyelt globális génexpressziós változások

Az egyes kísérleti változók által befolyásolt konkrét géneket kigyűjtve (1. táblázat) látható, hogy az EVk jelenlétében statisztikailag szignifikáns mértékben változott több gén kifejeződése mind pozitív, mind pedig negatív irányban. Felerősödött például a CNR2 és a WFIKK1 génjének átíródása, míg a CXCL14 és a TBXAS1 az EVk jelenlétében elcsendesedő génekre hozhatók fel példaként. A TNF hatása ugyanakkor inkább egyes gének (például az ICAM-1, a BCL3, az IL-8, a CXCL10, a CXCL11, a CXCL3) átíródásának fokozásával jellemezhető.

Az ismert módon markáns hatással rendelkező citokin TNF hatására – amint az várható is volt – igen sok gén kifejeződése megváltozott. Bár volt néhány olyan, a TNF által befolyásolt gén, amelynek változását csak akkor tudtuk kimutatni, ha EVk is jelen voltak a TNF mellett (23 gén), vagy ha EVk nem voltak jelen (19 gén), a TNF markáns hatásával összhangban a statisztikailag szignifikáns változást mutató gének jelentős részének (59 gén) átíródása hasonlóképpen változott mindkét olyan esetben, amikor TNF volt jelen a mintában.

5.2.2 A génkifejeződés globális változásainak reprodukálhatósága az egyedi gének szintjén

A számos elemzés eredményei és a szakirodalom áttekintése alapján is legjelentősebbnek vélt gének közül az IL-8, a CCL2, a CXCL2, a CD36, a CD82, az ICAM1, az NPC1, az MMP9, a CNR2 és az SMPD3 esetében megfigyelt változásokat igyekeztünk reprodukálni az egyedi gének kifejeződését vizsgáló módszerrel. Ezek alapján a microarray eredményeivel összhangban a TNF egyedileg és MVk egyidejű jelenlétében is statisztikailag szignifikáns mértékben fokozta a CXCL2 kifejeződését, azonban az EVk jelenlétében megfigyelt változást itt nem sikerült igazolni. Szintén összeegyeztethetők az MMP9 esetében megfigyelt változások (az EVk jelenlétéhez képest szignifikáns növekedés a másik két kísérleti felállásban) a microarray eredményeivel.

Az pedig, hogy a CCL2, az IL-8, a CD82, az ICAM1 és az NPC1 génátíródását pedig csak a két tényező (TNF és MVk) együttes jelenléte fokozta szignifikáns mértékben, egyfajta kölcsönhatásra utalhat az EVk és a TNF hatása között. Érdekes módon ez a jelenség sokkal jobban megfigyelhető volt az egyedi géneket vizsgálva, mint a microarray kísérlet eredményei alapján, ahol csupán három másik, kisebb jelentőségű génre volt igaz, hogy csak a két tényező együttes jelenléte mellett volt megfigyelhető szignifikáns változás. Sőt, a későbbi vizsgálataink eredménye szerint egyértelműen kölcsönhatást mutató IL-8 a microarray genexpressziós mintázatainak elemzése alapján még a döntően TNF hatása által befolyásolt csoportba került.

Többszörösen megerősítettük, hogy csak EVk jelenlétében fokozódik az SMPD3 kifejeződése szignifikáns mértékben, míg TNF jelenlétében akkor sem, ha mellette EVk is jelen vannak. Szintén elsősorban az EVk jelenléte befolyásolta kísérletünk során a CNR2 génjének kifejeződését. Itt akár antagonisztikus kölcsönhatás is felmerülhet az egyedi gének szintjén elvégzett vizsgálatunk alapján, mivel a statisztikailag szignifikáns különbség a TNF vagy az EVk egyedi jelenléte között mutatható ki. Nem teljes mértékben egyeztek globális és génszintű megfigyeléseink a CD36 tekintetében. Míg ugyanis a microarray adatai alapján elsősorban a TNF hatására nőtt expressziója, qRT-PCR módszerrel vizsgálva ez inkább az EVk hatására nőtt kismértékben.

5.2.3 *Az intakt EVk és az izolált MVk hatásának összevetése*

Az izolált MVk jelenlétében kapott adatok és a teljes EV-tartalmú kondicionált médium hatásának jó összevethetősége alapján kijelenthető, hogy az általunk felállított kísérleti rendszer legalább annyira alkalmas az EVk hatásának vizsgálatára, mint a szakirodalomban alkalmazott egyéb módszerek. Az izolált EVk hatására hasonló módon változott számos gén átíródása (pl. CCL2, IL-8 és CNR2), mint ahogyan azt az általunk javasolt alternatív megközelítés alapján elvégzett kísérletek eredményeként megfigyelhettük.

Nem tagadható azonban, hogy az izolált EV-preparátumok alkalmazása hordozhat többlet-információt is a teljes EV-tartalmú kondicionált médium alkalmazásához képest, vagy felerősödhetnek bizonyos jelenségek. Míg ugyanis a globális génexpressziós vizsgálatok során azt találtuk, hogy a CD36 génjének átíródása elsősorban TNF jelenlétében fokozódik, az egyedi gének kifejeződését kvantitatív, valósidejű PCR módszerrel vizsgálva már az EVk jelenlétében találtunk szignifikáns fokozódást a TNF jelenlétéhez képest. Ezt az ellentmondást részben akár segíthet is feloldani az a megfigyelés, hogy izolált EV-preparátumokat is felhasználva egy újabb kísérletben szignifikáns változást a kontrolhoz képest csak a MVk okoztak. Tekintettel arra, hogy a CCRF sejtvonal-eredetű EVk jellemzése során a kondicionált médiumban is legfőbbképpen – de nem kizárólagosan – MVk jelenlétét sikerült kimutatni, a teljes EV-preparátum mérsékelt, a globális génexpressziós vizsgálat segítségével a kimutathatóság határán maradó hatása könnyen megérthető.

Elképzelhető lenne, hogy ennek hátterében az izolálás után reszuszpendált üledékből nyert preparátumban a MVk nagyobb koncentrációja áll, s emiatt akár a teljes EV-koncentráció is eltérhetne a két kísérleti felállásban. Az egyes preparátumok fehérjetartalma alapján azonban arra következtethetünk, hogy az EVk mennyiségének a kiinduló sejtszámon alapuló standardizációja kielégítő eredményre vezetett. Nem tudtuk azonban teljes biztonsággal kizárni EV-aggregátumok jelenlétét, és az ebből eredően a már leírt műtermékek keletkezésének a lehetőségét. Végül a hosszas izolálási eljárás során az EVk egyéb módosulása (pl. oxidációja [457]) is bekövetkezhetett, amely szintén magyarázhatná az eredményeket.

Az sem jelent feltétlenül ellentmondást, hogy egyik izolált EV-preparátum esetében sem sikerült szignifikáns eltérést találnunk az IL-8 génkifejeződésében a kontrolhoz képest, hiszen ez a gén a globális génexpressziós vizsgálat adatai alapján is a III. klaszterbe tartozott, ahol változást elsősorban a TNF jelenléte okozott. Az IL-8 esetében tehát elsősorban a TNF és a TNF és izolált MVk együttes jelenléte során megfigyelhető változások reprodukálhatósága merült fel fontos kérdésként. A kísérletek megismételhetőségének további jelentőséget kölcsönzött, hogy az IL-8 esetében sikerült a globális génexpressziós vizsgálat eredményeit a fehérjék mennyiségének szintjén is megerősíteni.

Hogy teljesen kizárhassuk a CCRF sejtvonal kondicionált médiumában esetlegesen felelhető oldott állapotú jelátvivő molekulák zavaró hatását és a kísérleti elrendezés a lehető legjobban megfeleljen a szakirodalomban általánosan alkalmazott megközelítésnek, az IL-8 génjének kifejeződését szérumentes RPMI médiumban felvett, MV preparátum hozzáadása mellett is vizsgáltuk U937 sejteken. Ebben az esetben még markánsabban észlelhető volt a MVk és a TNF közötti kölcsönhatás jelensége, amennyiben csak a két tényező együttes jelenléte mellett értünk el szignifikáns változást az IL-8 génjének átíródásában.

5.2.4 Az EVk és a TNF hatása közötti kölcsönhatás természete

Az, hogy igen nagy átfedést találtunk a csak TNF vagy TNF és EVk jelenlétében fokozott átíródást mutató gének között arra utal, hogy a TNF hatása igen markáns az EVk hatásához képest. Ezt a jelentős hatást azonban vélhetőleg modulálni, finomhangolni képesek az EVk. Eredményeink alapján mindenestre nagyon valószínű, hogy létezik valamiféle kölcsönhatás az EVk és a citokinek, például a TNF hatása között. Találtunk ugyanis a globális génexpressziós változások elemzése során 23 olyan gént, aminek az expressziója statisztikailag szignifikáns mértékben változik EVk és TNF együttes jelenlétében, míg csak TNF jelenlétében nem tekinthető a változás statisztikailag szignifikánsnak. Ez a következtetés összhangban állna Wahlgren és munkatársai [388] megfigyeléseivel, akik T-sejtek által kibocsátott exoszómák és az IL-2 együttes jelenlétében keletkező citokinprofilokat elemezték.

Kísérleti rendszerünkben a legegységelműbb kölcsönhatás az IL-8 kifejeződésének szinergisztikus erősítése volt, ami szintén összhangban van a szakirodalomban leírtakkal. Egy, az általunk alkalmazotthoz hasonló kísérleti rendszerben az IL-8 szinovociták általi elválasztásának fokozódását mutatták ki vérlemezke eredetű MVk jelenlétében [391], ami arra utal, hogy következtetéseink más EV-donor és recipiens sejtpárok esetében is igazak lehetnek.

Meg kell jegyezni azonban, hogy az általunk megfigyelt kölcsönhatás természete génenként eltérő, és közel sem minden esetben pozitív. Összességében, funkcionális szempontból igen jelentősnek találtuk az antagonisztikus kölcsönhatásokat is. Ez azt eredményezheti, hogy az EVk számos, a gyulladás kialakulását és fenntartását elősegítő gén mellett az ezt gátló gének kifejeződését is elősegítik. Míg tehát a TNF hatása egyértelműen a gyulladás irányába tolja el az egyensúlyt, az EVk jelenléte ezt a hatást tompíthatja és a későbbi stádiumban a folyamat lecsendesítését is elősegíthetik.

5.3 Az EVk és a TNF kölcsönhatása által legjobban érintett biológiai folyamatok

5.3.1 Az EVk jelenlétében szignifikáns mértékben megváltozott egyes gének lehetséges biológiai szerepe

Az EVk jelenlétében statisztikailag szignifikáns mértékben felerősödött gének között számos olyan található, amelyek az intracelluláris vezikulák sejten belüli célbajuttatásával kapcsolatosak. A WFIKKN1 nevű gén szintén azok közé tartozik, amelyek megnövekedett mértékben íródtak át EVk jelenlétében. A gén terméke egy igen sok doménnel rendelkező, összetett fehérje, amelynek legjobban ismert funkciója mégis az, hogy a legkülönbébb proteáz enzimek (szerin proteázok és metalloproteázok) funkcióját képes gátolni [458]. Néhány olyan génnek a kifejeződése viszont, amelyek a gyulladásos folyamatok fenntartásában játszanak szerepet – mint például a neutrofilekre kemoattraktáns hatású CXCL14 kemokint kódoló géné, vagy a vérlemezkék aggregációjában is fontos tromboxán A2 létrehozásában fontos enzimet kódoló TBXAS1 géné –, statisztikailag szignifikáns módon csökkent az EVk hatására.

Az EVk hatására igen erősen fokozódott a kannabinoid receptor 2 (CNR2) génjének átíródása is. Érdekes módon EVk és TNF együttes jelenlétében nem figyelhettük meg a gén kifejeződésének fokozódását, ami valamiféle antagonisztikus kölcsönhatásra is utalhat a két tényező között. A CNR2 G-fehérje-kapcsolt receptort kódol, amely a kannabinoid receptor 1-gyel ellentétben perifériális szöveti eloszlást mutat és elsősorban az immunrendszer sejtjeinek felszínén jelenik meg [459]. Ennek megfelelően ez a receptor a kannabinoidok nem pszichoaktív hatásait (mint például az érzéstelenítés és az immunszuppresszió) közvetítik.

Bár a kannabinoid receptorokkal kapcsolatban igen kevés ismeret áll még rendelkezésünkre, a CNR2 gén által kódolt receptor máris nagy érdeklődést váltott ki. A lehetséges gyógyászati felhasználással kapcsolatos remények elsősorban a 2-es típusú kannabinoid receptor apoptózist kiváltó, érújdonképződést gátló és bőrdaganatok progresszióját lassító [460] hatásán alapulnak, amelyek mellett gyulladáscsökkentő és immunszuppresszív hatást is kifejthet [461]. A receptor ligandjai között a számos fűszernövényben is megtalálható β -kariofillén is szerepel, amely növényi alkaloida nagy valószínűséggel éppen a CNR2 receptoron keresztül fejti ki gyulladáscsökkentő hatását. Azokban a *Cnr2*^{-/-} egerekben ugyanis, amelyek nem rendelkeztek az emberi CNR2-vel homológ génnel, a β -kariofillén hatástalannak bizonyult [462].

Az, hogy az EVk jelenlétében a CNR2 génjének átíródása fokozódik, az EVk gyulladáscsökkentő hatására utalhat. Ezt megerősíthetné, ha a CNR2 gén által kódolt fehérje mennyiségében bekövetkező változást is ki tudnánk mutatni az EVk jelenlétében. Kísérleteink során Western blot módszerrel próbáltuk ezt a hatást megerősíteni, azonban a génkifejeződés változását a fehérje szintjén nem sikerült igazolni.

5.3.2 Az EVk és a TNF jelenlétében bekövetkező globális génexpressziós változások által érintett biológiai folyamatok

A TNF és EVk együttes jelenlétében megváltozott kifejeződést mutató génekhez köthető gén ontológiák által alkotott hálózat több alhálózatra (modulra) bontható, amelyeket modulonként a gyulladásos citokinek, az NF κ B út vonal, sejt felszíni receptorok, citokinek jelátvittele, membrán transzport és membránhoz kötött fehérjék határoznak meg. Ezek a fogalmak és biológiai funkciók valamennyien a gyulladással és a citokinekre való érzékenységgel kapcsolatosak, az ontológiákhoz kötődő legfontosabb gének pedig kemokinek és azok receptoraik.

A kemokinek közül is kiemelkedik az IL-8 mind a génkifejeződésbeli változás alapján, mind pedig azért, mert az IL-8 funkcionális doménjét tartalmazó más kemokinek génjeinek is fokozódott az átíródása. Éppen ezért fehérjeszintű vizsgálataink, illetve az izolált EVk jelenlétében elvégzett kísérleteink során is különös figyelmet szenteltünk ennek a kemokinnek. A neutrofil granulociták, bazofil granulociták, és T-sejtek migrációját igen nagy hatékonysággal képest befolyásolni az IL-8, mely számos szempontból kiemelkedő jelentőségű volt a kísérleteinkben. Amint azt az előzőekben kifejtettük, az EVk jelenlétében megfigyelhető IL-8 termelés tényét más munkacsoportok megfigyelései is megerősítik [148, 391].

5.4 A TNF és MVk közötti kölcsönhatás és feltételezhető háttere

5.4.1 Fehérjék vezikuláris átvitelének lehetséges szerepe a TNF jelátvitel befolyásolásában

A szakirodalomban több utalás is szerepel arra vonatkozóan, hogy az EVk működőképes fehérjéket képesek átvinni egyik sejtről a másikra (akár sejtfelszíni citokineket [148], receptorokat [150], ioncsatornákat [152] vagy transzkripciós faktorokat [142]). Ha kifejezetten a transzkripciós faktorokra koncentrálunk a GSEA elemzés során, akkor igen gyenge szignifikanciaszint mellett felmerül egy szterol regulatórikus elemhez kötődő faktor, a SREBF-1 szerepe az EVk jelenlétében megfigyelt hatásokban. Ugyan ez a transzkripciós faktor közvetlenül nem képest az IL-8 génexpresszióját fokozni, de a GeneMania segítségével felállított interakciós hálózat alapján a SREBF1 fizikailag kötődhet a CREB1 fehérjéhez, amely ismert módon befolyásolja az IL-8 szintjét. Az természetesen további kiterjedt vizsgálatokat igényel, hogy az EVk képesek-e ezt a transzkripciós faktort célba juttatni.

A GSEA elemzés adatai alapján továbbá az EVk hatására számos más olyan GO fogalmat is érintett változás, amelyek az NFκB jelátviteli útvonalában játszanak szerepet. Ez a fontos szabályozó elem részt vesz a TNF által elindított jelátviteli folyamatokban, és ismert módon szabályozza az IL-8 génjének átíródását. Ha az EVk jelenlétében megnő az útvonal működésében fontos fehérjék mennyisége, akkor ez esetleg előkészítheti a sejteket a TNF által kiváltott jel hatékonyabb továbbítására. Az elsődleges kérdés azonban ebben az esetben is az, hogy az EVk preparátumaiban jelen van-e egyáltalán ezek közül a szabályozó elemek közül valamelyik.

5.4.2 Az EVk és a MVk fehérjekészletének proteomikai elemzése

Mivel a CCRF sejtvonalon felülűszójának vizsgálata alapján a globális génexpressziós vizsgálat során megfigyelt hatásért döntően a MVk tehetők felelőssé, igyekeztünk ennek az EV típusnak a fehérjekészletét az irodalomban elérhető adatok alapján rekonstruálni. A szakirodalom áttekintése során feltűnő volt a nómenklatúra következetlen használata, így EV kategorizálásunk elsősorban az alkalmazott centrifugálási protokollon alapult. Nem publikált megfigyeléseink szerint ugyanis már igen rövid ideig tartó, közepes sebességű centrifugálás során is jelentős mennyiségű exoszóma ülepedik, ami zavarhatja a MVk tulajdonságainak meghatározását.

Az ily módon rekonstruált fehérjekészlet részben átfedett az EVpedia által nyilvántartott legfontosabb 500 fehérjével. Az egyes tanulmányok által közölt adatsorok kötött azonban csak mérsékelt étfedést találtunk, így azokat a fehérjéket, melyek a kritériumainknak megfelelő nyolc cikkben háromszor, vagy a kilenc adatsorban négyszer szerepeltek, már mikrovezikuláris fehérjeként kategorizáltuk. Ez is alátámasztja azt a vélekedést, miszerint az EVk egyes típusai sem egységesek, és összetételük sejttypustól és a körülményektől függően dinamikusan változhat.

Az EVk és citokinek hatása szempontjából mellékes megfigyelés, hogy mind az EVpedia alapján összeállított fehérjekészlet, mind pedig a MVk feltételezhető fehérjei szoros kapcsolatban álltak vírusfertőzések során leírt jelátviteli utakkal és funkcionális géncsoportokkal. Ez a megfigyelés mintegy validálja megközelítésünk helyességét, ugyanis ma már egyre világosabb, hogy az EVk keletkezése és a vírusok sejtéből való kijutása, illetve az EVk és a vírusok sejtekhez történő kapcsolódása hasonló módon megy végbe [191, 192, 463]. Az EVk vírusfertőzés során betöltött immunológiai szerepe ráadásul tovább erősíti az EVk és citokinek hatása között feltételezett kapcsolatot is [195, 464].

5.4.3 A MVk által szállított fehérjék lehetséges szerepe a TNF jelátvitelében

Nemcsak a vírusfertőzéshez kötődő fogalmak esetében figyelhető meg az EVk által szállított fehérjék vagy interakciós partnereik felülreprezentáltsága. Az EV fehérjék más folyamatokhoz képest szintén nagyobb mértékben befolyásoltak jelátviteli útvonalakat és az immunrendszer működését is. Az immunológiai szempontból jelentős jelátviteli folyamatok között találjuk a TNF jelátviteli utat is, aminek ugyan kevés tagját

találhatjuk meg EVk, és még kevésbé MVk belsejében, ám a fehérje-fehérje interakciók aránya szempontjából mégis kiemelkedik más folyamatok közül. Amennyiben a jelátviteli útvonal KEGG adatbázisban nyilvántartott tagjainak gátló és stimuláló vezikuláris interakciós partnereinek arányát vesszük figyelembe, feltűnő a TNF 1-es és 2-es típusú receptoráról induló jelátviteli útvonalak közötti eltérés. Ezek alapján felmerül, hogy az EVk jelenléte a TNF jelátvitelét a 2-es típusú receptorról induló jelátvitel felé tolja el a TRAF3 és BAG4 fehérjéket befolyásolva.

Egészen finom eltolódás az 1-es és 2-es típusú TNF receptorról induló jelátvitel közötti egyensúlyban már igen komoly biológiai következményekkel járhat [465–468]. Nem csak a jelátviteli útvonal intracelluláris elemeire fejthetnek ki hatást az EVk, hanem a TNF, mint membránfelszínhez kötött ligand is más biológiai hatással bír, mint a szolubilis forma [153, 404]. Ugyan kísérleti rendszerünkben nem találtunk arra utaló jelet, hogy a TNF membránhoz kötött, EVk felszínén jelenlévő formája állna a megfigyelt változások mögött, a TNF receptorainak vagy más TNF-kötő fehérjéknek a szerepét nem zárhatjuk ki.

Annál inkább sem, mert az EVk felszínén számos olyan fehérje van jelen, ami a TNF fehérjével interakcióba léphet, ily módon az EVk „szolubilis” TNF receptorként modulálhatnák a TNF hatását [153]. Az immunrendszer működéséhez hozzátartozik a „feleslegessé vált” TNF receptorok EVk segítségével történő eltávolítása a sejtfelszínről [469]. A TNF receptorok és –kötőfehérjék szerepével kapcsolatban arról sem szabad megfeledkezni, hogy TNF nemcsak ligand, hanem a receptorokhoz hasonlóan képes intracelluláris jelátviteli útvonalakat elindítani retrográd módon [402, 406], ez pedig interferálhat az anterográd útvonallal.

Végül a TNF útvonal és az EVk lehetséges interakciójára vonatkozóan érdekes adalékkal szolgál az a megfigyelés, miszerint influenza virionok és TNF esetében is szinergisztikus hatást figyeltek meg az NF κ B útvonal aktiválásához kapcsolódóan. Amennyiben azt is figyelembe vesszük, hogy az EVk kötődése és a vírusfertőzés között számos hasonlóság fedezhető fel, egyértelmű az analógia a kísérleteink során megfigyeltekkel. Kérdés marad azonban, hogy ez a kölcsönhatás vajon a citokinek élettani hatásainak szabályozásában fontos elsődlegesen, és csak az analógia miatt figyelhető meg vírusok esetében is, vagy az összefüggés fordítva igaz.

5.4.4 Az EVk jelenlétében létrejövő változásokért felelőssé tehető miRNS molekulák

A génexpresszió globális változásainak elemzése során EVk jelenlétében a TNF-el összehasonlítva igen sok (mintegy 39) gén kifejeződésének csökkenését figyeltük meg, ami arra is utalhat, hogy az EVk RNS-tartalma tehető felelőssé a kimutatott hatásokért. Az EVk közül az exoszómák ugyanis jól ismert módon képesek sejtek között RNS molekulák átvitelét közvetíteni [23], és ez a funkció nagy valószínűséggel a MVk esetében is jelen van [470]. Az is jól ismert, hogy a miRNS-ek nagyon fontos szerepet játszanak az immunrendszer működésének szabályozásában – elsősorban a célgének működésének gátlása révén [471].

Az IL-8 kitüntetett szerepe alapján pedig párhuzam vonható kísérleti rendszerünk és Baj-Krzyworzeka és munkatársai megfigyelései között [32]. Ebben a kísérleti rendszerben ráadásul nem is feltétlenül miRNS molekulák, hanem magának a mRNS molekulának a szerepe merült fel. Leírták ugyanis, hogy a tumoros sejtekből származó MVk tartalmazzák az IL-8 fehérjét kódoló mRNS molekulát, és talán éppen erről íródik át a recipiens monocita sejtek által többletként termelt fehérje. Az IL-8 mellett továbbá más kemokinek (pl CCL2, CCL3, CCL4 és CCL5) termelése is fokozódik. Árnyalja azonban a képet, hogy ebben az esetben sem zárható ki teljes biztonsággal a miRNS molekulák szerepe, valamint hogy magát az IL-8 fehérjét is sikerült kimutatni az EVk preparátumában ugyanebben a kísérleti rendszerben.

Elemzésünk során ugyan nem sikerült teljes biztonsággal azonosítani olyan miRNS molekulákat, amelyek felelőssé tehetőek az EVk jelenlétében megfigyelt génexpressziós változásokért, azonban ez nem zárja ki szerepüket. Az elemzésünk alapján leginkább releváns néhány miRNS molekulát ugyan nem találjuk az EVk által eddigiekben kísérletesen megerősített módon szállított entitások között, azonban az EVk heterogenitása alapján teljességgel elképzelhető, hogy az általunk vizsgált sejttípus adott körülményekre adott válaszához ilyen tartalmú EVk kibocsátása társul. A hsa-miR-3676-3p, hsa-miR-1287-3p, hsa-miR-431-3p, hsa-miR-147b, hsa-miR-6829-5p és hsa-miR-3620-5p miRNS molekulák kimutatása a CCRF sejtvonal felülúszójából izolált EVk preparátumából eddigi munkánk egyik lehetséges folytatása.

5.4.5 Az EVk jelenlétében létrejövő változások hasonlósága az oxidált foszfolipidek esetében megfigyelt hatással

Az EVk belsejében található fehérjéken és RNS-eken kívül a lipidmembrán felszínén jelenlévő ligandok (fehérjék, szénhidrátok és lipidek egyaránt) szerepe szintén nem zárható ki. Ennek kapcsán különösen érdekes a GSEA elemzés azon eredménye, miszerint az EVk jelenlétében az U937 humán monocita sejtvonalon megfigyelt génexpressziós változások nagy hasonlóságot mutattak azokkal a változásokkal, amelyek oxidált foszfolipidek jelenlétében következtek be endotél sejteken [449].

Szintén az oxidált foszfolipidek felismerésében játszik fontos szerepet scavenger receptorként [472] az a CD36, melynek átíródását kvantitatív, valósídejű PCR segítségével emelkedettnek találtuk EVk – és különösen MVk – jelenlétében. A CD36 képes oxidált foszfatidil-szerinhez is kötődni, amely révén az apoptotikus testek felvételét is elősegíti [473]. Sőt, egy másik közlemény szerint az EVk felvételében is szerepe van [474]. Az a megfigyelés, hogy az EVk hatására fokozódik egy olyan gén átíródása, amelynek fehérjeterméke az EVk recipiens sejtekhez való kötődését is elősegíti, akár pozitív visszacsatolási kör jelenlétére is utalhat.

Ennek az eredménynek a jelentőségét minden bizonnyal csak évek múltán lehet megítélni, hiszen az EVk miRNS- és fehérjetartalmához képest igen keveset tudunk azok lipid-összetételéről és a lipidek biológiai hatásáról. Ennek vizsgálatával egy teljesen új kutatási irány nyílhat meg az EV-biológiában [475], mint ahogyan az EVk posztranszlációs módosulásainak – többek között oxidációjának – is nagy biológiai relevanciája lehet megfigyelésünk alapján [457].

6 Következtetések

6.1 A CCRF sejtvonal felülúszójában található EVk és citokinek

I.a. A CCRF humán T-sejtes sejtvonal felülúszójában 24 óra elteltével megtalálhatók EVk, amelyek felszínén Annexin V, CD63, CD71 és CD33 felszíni markerek voltak kimutathatók, míg CD5 és CD9 nem. A felülúszó ultracentrifugálásával nyerhető üledék elektronmikroszkópos vizsgálatával kettős foszfolipidmembránnal határolt struktúrákat sikerült kimutatni. Az EVk modális mérete 350 nm körüli értéknek adódott, ami alapján kijelenthetjük, hogy a nyugvó CCRF humán T-sejtes sejtvonal felülúszójában elsősorban MVk találhatók.

I.b. A kísérleti rendszerünkben felhasznált kontroll felülúszó valóban elhanyagolható mennyiségű EV-t tartalmazott. Az ebből a preparátumból ultracentrifugálással nyert üledékben sem elektronmikroszkóppal, sem pedig Coulter-elven történő részecskeszámlálással nem sikerült EVk jelenlétét kimutatni.

I.c. A CCRF humán T-sejtes sejtvonal felülúszójában 10 pg/ml nagyságrendben található TNF, amely elhanyagolható az általunk alkalmazott rekombináns citokin koncentrációjához képest. Az izolált MVk ennél jóval kisebb mennyiségben tartalmaztak TNF citokint.

6.2 Az EVk és TNF jelenlétében megfigyelt génexpressziós változások

II.a. A CCRF humán T-sejtes sejtvonal által kibocsátott EVk és TNF együttes jelenléte hatására egyes kemokinek, mint például az IL-8 kifejeződése jobban fokozódik, mint a TNF egyedüli jelenléte mellett az U937 humán monocita sejtvonal sejtjein. Az EVk hatására legalább olyan jelentős a globális génátíródás csökkenése, mint annak növekedése, amelynek hátterében miRNS molekulák szerepe is felmerülhet.

II.b. Összességében elmondható, hogy az EVk jelenléte ellensúlyozza a TNF egyes hatásait, míg másokat potencióz. A TNF igen markáns hatása mellett azonosíthatók olyan géncsoportok is, amelyek expressziója elsősorban EVk jelenlétében változik meg. Az EVk hatására jellemzően csökkent génkifejeződést láttunk, azonban a két tényező (EVk és TNF) együttes jelenléte mellett számos gén kifejeződésének növekedése is megfigyelhető – még hozzá nagyobb mértékben, mint külön-külön. Ez arra utal, hogy azonosítható a géneknek egy kis csoportja, amelyek esetében az EVk és

a TNF hatása egymást segíti. Más esetekben pedig az EVk jelenléte tompítja a TNF hatását a gyulladásos folyamatok korlátozásának irányába hatva. A funkcionális géncsoportok kifejeződésének vizsgálata során legjelentősebbnek az IL-8, a CCL2, a CXCL2, a CD36, a CD82, az ICAM1, az NPC1, a MMP9, a CNR2 és az SMPD3 gének átíródásában bekövetkező változásokat tartottuk.

II.c. Ezeknek a géneknek a kifejeződését qRT-PCR módszerrel vizsgálva megerősítettük, az EVk jelenlétében statisztikailag szignifikáns mértékben növekedett az SMPD3 kifejeződése a kontrollhoz képest, míg a CD36 és a CNR2 kifejeződése a TNF jelenlétéhez képest nőtt jelentős mértékben. Az IL-8, a CCL2, a CD82, az ICAM1 és az NPC1 gének átíródását az EVk és TNF együttes jelenléte nagyobb mértékben fokozza, mint a két tényező külön-külön. Ezt a jelenséget az IL-8 esetében a fehérjetermék szintjén is sikerült kimutatni ELISA módszerrel.

II.d. Amikor az EVk egyes típusait külön-külön vizsgáltuk, szintén sikerült kölcsönhatást kimutatni az EVK és a TNF hatása között az IL-8 esetében. A CCRF humán T-sejtes sejtvonal felülúszójából izolált MVk és TNF együttes jelenlétének hatására az IL-8 kifejeződése ugyanis szignifikáns mértékben jobban fokozódik, mint a TNF vagy a MVk egyedüli jelenléte mellett az U937 humán monocita sejtvonal sejtjein.

6.3 Az EVk jelenléte által feltételezhetően befolyásolt biológiai folyamatok

II.a. A GO PANTHER elmezése alapján nem sikerült ugyan olyan, funkcionálisan összetartozó géncsoportokat azonosítani, amelyek kifejeződése szignifikáns mértékben megváltozott volna, ugyanakkor fontos leszögezni, hogy elsősorban a jelátvitellel, szabályozással és metabolizmussal kapcsolatos gének érintettségét láttuk. Az EVk jelenlétében megfigyelt átlagos relatív génexpressziós értékeket a Reactome adatbázis fogalmi hálózatára vetítve leginkább a FGFR1, a WNT (csökkenés) és az ERK (növekedés) jelátviteli útvonalak érintettsége merült fel. A metabolikus útvonalak közül pedig elsősorban a foszfolipidek metabolizmusához kötődik génkifejeződésbeli változás. A szignifikáns változást mutató gének között a GeneMania eredményei alapján legjelentősebb közös tulajdonság a citokróm P450, furin ismétlődés, valamint a T-SNARE és az IL-8-szerű domének jelenléte.

III.b. A GSEA módszer segítségével sikerült azonosítani számos olyan biológiai folyamatot és funkciót, amelyek statisztikailag szignifikáns mértékben megváltozott kifejeződést mutatnak. Kiemelkedik ezek közül a gyulladásos válasz, a JAK/STAT és az NF κ B kaszkádok érintettsége EVk jelenlétében. Amennyiben a két tényező együttes hatását a TNF egyedi hatásához hasonlítottuk GSEA módszer segítségével, szintén az NF κ B kaszkád, a sejtfelszíni receptorok, valamint a glikozilációban résztvevő enzimek érintettsége igazolódott. Ezeknek a csoportoknak a génkifejeződés szempontjából központi szerepet játszó tagjai többek között a CXCL10, a CCL2, az IL8 és a GPR68 gének voltak.

III.c. Az IL-8 termelésének fokozódásával és a kemokinek GSEA által kimutatott kiemelt jelentőségével összhangban áll az eredmény is, hogy a TNF és a CCRF sejtvonal által kibocsátott MVk jelenlétében tenyésztett U937 sejtek kemoattraktáns képessége felülmúlja a két tényező egyedi jelenlétében megfigyelhető mértéket. A kontrollhoz képest statisztikailag szignifikáns változást csak ebben az esetben sikerült kimutatnunk.

6.4 Az EVk és MVk TNF jelátvitel szempontjából vélhetően releváns tulajdonságainak felderítése

IV.a. A MVk preparátumához rekombináns citokint adva, majd az oldatban maradt citokint eltávolítva nem találtunk arra utaló adatot, hogy vezikuláink felszínére TNF kötődött volna, és ez okozta volna az EVk jelenlétében megfigyelt változásokat.

IV.b. A szakirodalom elemzése alapján valószínűsíthetően MVk preparátumaiból kimutatott fehérjék között több mint száz olyan fehérjék sikerült összesíteni, amelyek több vizsgálat adatai alapján is kimutathatók voltak MVk preparátumaiban. Ezen fehérjék túlnyomó többsége szerepel az EVpedia által nyilvántartott legjelentősebb 500 fehérje között. Mindkét proteom nagy arányban tartalmaz vírusfertőzéshez és a vírusok életciklusához köthető fehérjéket. Sem az EVpedia által nyilvántartott legjelentősebb 500 fehérje, sem a MVk fehérjekészletéről általunk összeállított konszenzus lista, sem pedig az aktivált CCRF humán sejtvonal által kibocsátott MVk fehérjéit kódoló gének expressziójában nem találtunk viszont szignifikáns különbséget az összes gén esetében megfigyeltekhez képest.

IV.c. Az EVk és az EVk által szállított fehérjék génregulációs kapcsolatait a TRRUST és a RegNetwork adatbázisok adatai alapján felvázolva azonosítható néhány olyan transzkripció faktor, amelyek által szabályozott gének kifejeződésében átlagosan igen nagy változás következik be EVk jelenlétében. Ilyen vezikuláris fehérjék a TSG101, az enoláz, és a Ku autoantigén komplex tagjai, amelyek feltételezett génregulációs aktivitása biológiai jelentőségének felméréséhez további kísérletek szükségesek. Amennyiben a Reactome adatbázis alapján gátló és stimuláló, a vezikuláris fehérjék és a kísérleti eredményeink alapján felállított funkcionális csoportok tagjai között kialakuló fehérje-fehérje kölcsönhatások arányát vesszük figyelembe, felmerül a TNF 1-es és 2-es típusú receptorairól induló jelátvitelre gyakorolt várható hatások közötti különbség szerepe.

A TNF jelátviteli útvonalának KEGG adatbázisban nyilvántartott tagjai közül többre is hatnak az EVpedia szerint az EVk által bizonyítottan szállított miRNS molekulák. Közülük több olyat is találtunk, amelyekhez köthető génexpressziós mintázatot az EVk jelenlétében mért adatok között is sikerült azonosítanunk mind a GSEA módszer, mind a miRWalk szolgáltatás segítségével. Azonban az ilyen módon azonosított miRNS molekulák által szabályozott összes gén átlagos kifejeződésében nem sikerült a várható mértékű csökkenést kimutatni. A legnagyobb mértékű átlagos csökkenést mutató hsa-miR-3676-3p, hsa-miR-1287-3p, hsa-miR-431-3p, hsa-miR-147b, hsa-miR-6829-5p és hsa-miR-3620-5p miRNS molekulák pedig nem szerepelnek az EVpedia nyilvántartásában.

A fehérjék és a miRNS molekulák szerepe mellett egy harmadik tényező jelentőségére hívja fel a figyelmet az EVk jelenlétében megfigyelt génexpressziós mintázatok GSEA módszerrel elvégzett elemzése. Az ugyanis, hogy igen erős hasonlóságot találunk az oxidált foszfolipidek jelenlétében mások által megfigyelt változásokkal, azt a lehetőséget is felveti, hogy az EVk hatásainak egy részéért az általuk szállított lipidtermészetű mediátorok, vagy akár az EVk poszttranszlációs módosulásai (például oxidációja) is felelősek lehetnek.

7 Összefoglalás

Az extracelluláris vezikulák (EVk) apró (néhány 100 nm átmérőjű), kettős lipid membránnal határolt struktúrák, melyek fontos szerepet töltenek be a sejtek közötti kommunikációban. A legkülönbézetesebb testfolyadékokban fellelhető EVk ugyanabban az extracelluláris térben helyezkednek el, ahol az oldott állapotú jelátvivő anyagok (például hormonok, citokinek). A szakirodalomban alkalmazott kísérleti rendszerek ennek ellenére jellemzően csak az egyik vagy másik tényező elkülönített hatásának kimutatását célozzák. Munkacsoportunk az elsők között vizsgált olyan kísérleti rendszert, amelyben az EVk és citokinek együttes hatását is ki lehet mutatni azt feltételezve, hogy a két tényező együttes hatása eltér az egyedi hatások összegétől.

Feltevésünk helyességének ellenőrzésére U937 humán monocita sejteket tenyésztettünk CCRF akut limfoblasztos leukémiás sejtvonal által termelt EVk jelenlétében rekombináns humán TNF citokin hozzáadásával, illetve a citokin hozzáadása nélkül. A megfigyelt globális változásokat az egyedi gének szintjén és a felülíróban általunk kimutatott egyes EV típusok elkülönített alkalmazásával is megerősítettük. A mért változások hátterében feltételezhető vezikuláris összetevőket az EVk fehérje- és miRNS-tartalmának *in silico* elemzése révén igyekeztünk feltárni.

Eredményeink alapján az EVk önmagukban is számos, gyulladással és jelátvitellel kapcsolatos gén kifejeződését szabályozták, a TNF citokinnel pedig részben additív, részben antagonisztikus kölcsönhatást mutattak. Többszörösen megerősítettük a kölcsönhatás tényét az IL-8 esetében (gén és fehérjetermék szintjén, valamint funkcionális szempontból egyaránt). Az EVk összetevőinek elemzése során a TNF receptorok, a CREB fehérjecsald, az enoláz és a Ku autoantigén, valamint számos miRNS molekula és az EVk foszfolipid membránjának szerepe is felmerült, ezek valós jelentőségének igazolása azonban további *in vitro* vizsgálatokat igényel.

Az EVk és egy modell citokin, a TNF hatása között munkánk során kimutatott kölcsönhatás felhívja a figyelmet arra, hogy a citokinek hatásának (és klinikai jelentőségének) értékelésekor nem hanyagolható el az extracelluláris kompartmentben fiziológias körülmények között megtalálható EVk szerepe sem.

8 Summary

Extracellular vesicles (EVs) are small (with a diameter of few 100 nm), membrane-surrounded structures of fundamental importance in intercellular communication. They can be found in various bodily fluids, in the same extracellular compartment, where soluble mediators (e.g. hormones and cytokines) can also be found. Despite of the many shared features predisposing for interference, the typical experimental setup dedicated to the investigation of one factor ignores the possible impact of the other on the results.

Our research group was among the first ones to recognize this problem and in an attempt to clarify the nature of interaction between cytokines and EVs, set out to study the global changes in gene expression of U937 monocytic cells in the simultaneous presence of CCRF T cell EVs and recombinant TNF. The observed changes were confirmed on the level of individual genes and gene products, as well as regarding isolated populations of EVs. Those components of EVs that can possibly be responsible for the resulting gene expression patterns, were identified *in silico*.

Based on results of our study, EVs regulated many genes related to inflammation and signal transduction. In the simultaneous presence of EVs and TNF, an additive interaction can be observed in case of some genes, while an antagonism in case of others. The existence of an interaction has been confirmed multiple times (based on the level of gene expression, protein secretion and function) regarding IL-8. According to *in silico* analysis of EV components, TNF receptors, CREB proteins, enolase and the Ku autoantigen, as well as numerous miRNAs and phospholipids of the EV membrane might simultaneously exert a complex effect on recipient cells that results in the interaction. Individual effects however, have yet to be determined *in vitro*.

Our results provide evidence for an interaction between a model cytokine (TNF) and EVs physiologically present in the same extracellular compartment. Given this interaction, the role of EVs should not be ignored when evaluating the effects (and clinical importance) of cytokines.

9 Irodalomjegyzék

1. György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, László V, Pállinger É, Pap E, Kittel Á, Nagy G, Falus A, Buzás EI (2011) Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci CMLS* 68:2667–2688.
2. van der Pol E, Boing AN, Gool EL, Nieuwland R (2016) Recent developments in the nomenclature, presence, isolation, detection and clinical impact of extracellular vesicles. *J Thromb Haemost* 14:48–56.
3. Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ (2010) Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics* 73:1907–1920.
4. Thery C, Zitvogel L, Amigorena S (2002) Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2:569–579.
5. Thery C (2011) Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. *F1000 Biol Rep* 3:15.
6. Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R (2012) Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta* 1820:940–8.
7. Yanez-Mo M, Siljander PR-M, Andreu Z, Zavec AB, Borrás FE, Buzas EI, Buzas K, Casal E, Cappello F, Carvalho J, Colás E, Cordeiro-da Silva A, Fais S, Falcon-Perez JM, Ghobrial IM, Giebel B, Gimona M, Graner M, Gursel I, Gursel M, Heegaard NHH, Hendrix A, Kierulf P, Kokubun K, Kosanovic M, Kralj-Iglic V, Kramer-Albers EM, Laitinen S, Lässer C, Lener T, Ligeti E, Line A, Lipps G, Llorente A, Lötvall J, Mancek-Keber M, Marcilla A, Mittelbrunn M, Nazarenko I, Nolte-'t Hoen ENM, Nyman TA, O'Driscoll L, Olivan M, Oliveira C, Pállinger E, Del Portillo HA, Reventos J, Rigau M, Rohde E, Sammar M, Sanchez-Madrid F, Santarem N, Schallmoser K, Ostenfeld MS, Stoorvogel W, Stukelj R, Van der Grein SG, Vasconcelos MH, Wauben MHM, De Wever O (2015) Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* 4:27066.
8. Pienimaeki-Roemer A, Kuhlmann K, Bottcher A, Konovalova T, Black A, Orso E, Liebisch G, Ahrens M, Eisenacher M, Meyer HE, Schmitz G (2015) Lipidomic and proteomic characterization of platelet extracellular vesicle subfractions from senescent platelets. *Transfus Paris* 55:507–521.
9. Laulagnier K, Motta C, Hamdi S, Roy S, Fauvelle F, Pageaux JF, Kobayashi T, Salles JP, Perret B, Bonnerot C, Record M (2004) Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. *Biochem J* 380:161–171.
10. Llorente A, Skotland T, Sylvanne T, Kauhanen D, Rog T, Orlowski A, Vattulainen I, Ekroos K, Sandvig K (2013) Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1831:1302–1309.
11. Choi D-S, Kim D-K, Kim Y-K, Gho YS (2013) Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes. *Proteomics* 13:1554–1571.

12. Connor DE, Exner T, Ma DDF, Joseph JE (2010) The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib. *Thromb Haemost* 103:1044–1052.
13. Kreimer S, Belov AM, Ghiran I, Murthy SK, Frank DA, Ivanov AR (2015) Mass-spectrometry-based molecular characterization of extracellular vesicles: lipidomics and proteomics. *J Proteome Res* 14:2367–2384.
14. Andreu Z, Yanez-Mo M (2014) Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front Immunol* 5:442.
15. Perez-Hernandez D, Gutierrez-Vazquez C, Jorge I, Lopez-Martin S, Ursa A, Sanchez-Madrid F, Vazquez J, Yanez-Mo M (2013) The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes. *J Biol Chem* 288:11649–11661.
16. Szarkándi JG, Szabó GT (2014) Csomagküldő szolgálat a sejtjeink között. *Élet és Tudomány* 40:1262-1263.
17. Connolly KD, Guschina IA, Yeung V, Clayton A, Draman MS, Von Ruhland C, Ludgate M, James PE, Rees DA (2015) Characterisation of adipocyte-derived extracellular vesicles released pre- and post-adipogenesis. *J Extracell Vesicles* 4:29159.
18. Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, Dingli F, Loew D, Tkach M, Thery C (2016) Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci U A* 113:E968-77.
19. Gerlach JQ, Griffin MD (2016) Getting to know the extracellular vesicle glycome. *Mol Biosyst* 12:1071–1081.
20. Barres C, Blanc L, Bette-Bobillo P, Andre S, Mamoun R, Gabius H-J, Vidal M (2010) Galectin-5 is bound onto the surface of rat reticulocyte exosomes and modulates vesicle uptake by macrophages. *Blood* 115:696–705.
21. Altadill T, Campoy I, Lanau L, Gill K, Rigau M, Gil-Moreno A, Reventos J, Byers S, Colas E, Cheema AK (2016) Enabling Metabolomics Based Biomarker Discovery Studies Using Molecular Phenotyping of Exosome-Like Vesicles. *PLoS One* 11:e0151339.
22. Holmgren L, Szeles A, Rajnavölgyi E, Folkman J, Klein G, Ernberg I, Falk KI (1999) Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Blood* 93:3956–3963.
23. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lötvall JO (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9:654–U72.
24. Wahlgren J, Statello L, Skogberg G, Teleme E, Valadi H (2016) Delivery of Small Interfering RNAs to Cells via Exosomes. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 1364:105–125.
25. Ridder K, Sevko A, Heide J, Dams M, Rupp A-K, Macas J, Starmann J, Tjwa M, Plate KH, Sultmann H, Altevogt P, Umansky V, Momma S (2015) Extracellular

- vesicle-mediated transfer of functional RNA in the tumor microenvironment. *Oncoimmunology* 4:e1008371.
26. Chakraborty SK, Prakash A, Nechooshtan G, Hearn S, Gingeras TR (2015) Extracellular vesicle-mediated transfer of processed and functional RNY5 RNA. 21:1966–79.
 27. Stoorvogel W (2012) Functional transfer of microRNA by exosomes. *Blood* 119:646–648.
 28. Bergsmedh A, Szeles A, Henriksson M, Bratt A, Folkman MJ, Spetz AL, Holmgren L (2001) Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6407–6411.
 29. Lässer C, Alikhani VS, Ekström K, Eldh M, Paredes PT, Bossios A, Sjöstrand M, Gabrielsson S, Lötvall J, Valadi H (2011) Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. *J Transl Med* 9:9.
 30. Wahlgren J, De L Karlson T, Brisslert M, Vaziri Sani F, Telemo E, Sunnerhagen P, Valadi H (2012) Plasma exosomes can deliver exogenous short interfering RNA to monocytes and lymphocytes. *Nucleic Acids Res* 40:e130.
 31. van der Pol E, Boing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R (2012) Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev* 64:676–705.
 32. Raposo G, Stoorvogel W (2013) Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 200:373–383.
 33. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J (2009) Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol* 19:43–51.
 34. Heijnen HFG, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ (1999) Activated platelets release two types of membrane vesicles: Microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* 94:3791–3799.
 35. Lötvall J, Hill AF, Hochberg F, Buzás EI, Di Vizio D, Gardiner C, Ghossein YS, Kurochkin IV, Mathivanan S, Quesenberry P, Sahoo S, Tahara H, Wauben MH, Witwer KW, Thery C (2014) Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles* 3:26913.
 36. Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötvall J, Nolte-’t Hoen EN, Piper MG, Sivaraman S, Skog J, Thery C, Wauben MH, Hochberg F (2013) Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J. Extracell. Vesicles* 2:20360
 37. Yuana Y, Levels J, Grootemaat A, Sturk A, Nieuwland R (2014) Co-isolation of extracellular vesicles and high-density lipoproteins using density gradient ultracentrifugation. *J. Extracell. Vesicles* 3:23262
 38. Cantin R, Diou J, Belanger D, Tremblay AM, Gilbert C (2008) Discrimination between exosomes and HIV-1: Purification of both vesicles from cell-free supernatants. *J Immunol Methods* 338:21–30.

39. Minciacchi VR, Freeman MR, Di Vizio D (2015) Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes. *Semin Cell Dev Biol* 40:41–51.
40. Hoog JL, Lötvalld J (2015) Diversity of extracellular vesicles in human ejaculates revealed by cryo-electron microscopy. *J Extracell Vesicles* 4:28680.
41. Dubois L, Ronquist KKG, Ek B, Ronquist G, Larsson A (2015) Proteomic Profiling of Detergent Resistant Membranes (Lipid Rafts) of Prostatomes. *Mol Cell Proteomics MCP* 14:3015–3022.
42. Thery C, Ostrowski M, Segura E (2009) Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* 9:581–593.
43. Islam A, Jones H, Hiroi T, Lam J, Zhang J, Moss J, Vaughan M, Levine SJ (2008) cAMP-dependent protein kinase a (PKA) signaling induces TNFR1 exosome-like vesicle release via anchoring of PKA regulatory subunit RII beta to BIG2. *J Biol Chem* 283:25364–25371.
44. Lazaro-Ibanez E, Sanz-Garcia A, Visakorpi T, Escobedo-Lucea C, Siljander P, Ayuso-Sacido A, Yliperttula M (2014) Different gDNA content in the subpopulations of prostate cancer extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles, and exosomes. *The Prostate* 74:1379–1390.
45. Crescitelli R, Lässer C, Szabó TG, Kittel Á, Eldh M, Dianzani I, Buzás EI, Lötvalld J (2013) Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *J. Extracell. Vesicles* 2:20677.
46. Keerthikumar S, Gangoda L, Liem M, Fonseka P, Atukorala I, Ozcitti C, Mechler A, Adda CG, Ang C-S, Mathivanan S (2015) Proteogenomic analysis reveals exosomes are more oncogenic than ectosomes. *Oncotarget* 6:15375–15396.
47. Tong M, Kleffmann T, Pradhan S, Johansson CL, DeSousa J, Stone PR, James JL, Chen Q, Chamley LW (2016) Proteomic characterization of macro-, micro- and nano-extracellular vesicles derived from the same first trimester placenta: relevance for feto-maternal communication. *Hum Reprod Oxf Engl* 31:687–699.
48. Turiák L, Misják P, Szabó TG, Aradi B, Pálóczi K, Ozohanics O, Drahos L, Kittel Á, Falus A, Buzás EI, Vékey K (2011) Proteomic characterization of thymocyte-derived microvesicles and apoptotic bodies in BALB/c mice. *J Proteomics* 74:2025–2033.
49. Willms E, Johansson HJ, Mager I, Lee Y, Blomberg KEM, Sadik M, Alaarg A, Smith CIE, Lehtio J, El Andaloussi S, Wood MJA, Vader P (2016) Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. *Sci Rep* 6:22519.
50. Little KM, Smalley DM, Harthun NL, Ley K (2010) The Plasma Microparticle Proteome. *Semin Thromb Hemost* 36:845–856.
51. Smalley DM, Root KE, Cho HJ, Ross MM, Ley K (2007) Proteomic discovery of 21 proteins expressed in human plasma-derived but not platelet-derived microparticles. *Thromb Haemost* 97:67–80.
52. Flaumenhaft R, Dilks JR, Richardson J, Alden E, Patel-Hett SR, Battinelli E, Klement GL, Sola-Visner M, Italiano JE (2009) Megakaryocyte-derived

- microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles. *Blood* 113:1112–1121.
53. Romancino DP, Paterniti G, Campos Y, De Luca A, Di Felice V, d'Azzo A, Bongiovanni A et al (2013) Identification and characterization of the nano-sized vesicles released by muscle cells. *FEBS Lett* 587:1379–1384.
 54. Johansson SM, Admyre C, Scheynius A, Gabrielsson S (2008) Different types of in vitro generated human monocyte-derived dendritic cells release exosomes with distinct phenotypes. *Immunology* 123:491–499.
 55. Bode AP, Orton SM, Frye MJ, Udis BJ (1991) Vesiculation of Platelets during Invitro Aging. *Blood* 77:887–895.
 56. Momen-Heravi F, Bala S, Kodys K, Szabó G (2015) Exosomes derived from alcohol-treated hepatocytes horizontally transfer liver specific miRNA-122 and sensitize monocytes to LPS. *Sci Rep* 5:9991.
 57. Royo F, Schlangen K, Palomo L, Gonzalez E, Conde-Vancells J, Berisa A, Aransay AM, Falcon-Perez JM (2013) Transcriptome of extracellular vesicles released by hepatocytes. *PLoS One* 8:e68693.
 58. Genneback N, Hellman U, Malm L, Larsson G, Ronquist G, Waldenstrom A, Morner S (2013) Growth factor stimulation of cardiomyocytes induces changes in the transcriptional contents of secreted exosomes. *J. Extracell. Vesicles* 2:20167
 59. Wubbolts R, Leckie RS, Veenhuizen PTM, Schwarzmann G, Mobius W, Hoernschemeyer J, Slot JW, Geuze HJ, Stoorvogel W (2003) Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes - Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J Biol Chem* 278:10963–10972.
 60. Morhayim J, van de Peppel J, Demmers JAA, Kocer G, Nigg AL, van Driel M, Chiba H, van Leeuwen JP (2015) Proteomic signatures of extracellular vesicles secreted by nonmineralizing and mineralizing human osteoblasts and stimulation of tumor cell growth. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 29:274–285.
 61. de Jong OG, Verhaar MC, Chen Y, Vader P, Gremmels H, Posthuma G, Schiffelers RM, Gucsek M, van Balkom BWM (2012) Cellular stress conditions are reflected in the protein and RNA content of endothelial cell-derived exosomes. *J Extracell Vesicles*. 1:18396.
 62. Gustafson CM, Shepherd AJ, Miller VM, Jayachandran M (2015) Age- and sex-specific differences in blood-borne microvesicles from apparently healthy humans. *Biol Sex Differ* 6:10.
 63. Danielson KM, Estanislau J, Tigges J, Toxavidis V, Camacho V, Felton EJ, Khoory J, Kreimer S, Ivanov AR, Mantel P-Y, Jones J, Akuthota P, Das S, Ghiran I (2016) Diurnal Variations of Circulating Extracellular Vesicles Measured by Nano Flow Cytometry. *PLoS One* 11:e0144678.
 64. Fruhbeis C, Helmig S, Tug S, Simon P, Kramer-Albers E-M (2015) Physical exercise induces rapid release of small extracellular vesicles into the circulation. *J Extracell Vesicles* 4:28239.
 65. Macri S, Pavesi E, Crescitelli R, Aspesi A, Vizziello C, Botto C, Corti P, Quarello P, Notari P, Ramenghi U, Ellis SR, Dianzani I (2015)

- Immunophenotypic Profiling of Erythroid Progenitor-Derived Extracellular Vesicles in Diamond-Blackfan Anaemia: A New Diagnostic Strategy. *PLoS One* 10:e0138200.
66. Dujardin S, Begard S, Caillierez R, Lachaud C, Delattre L, Carrier S, Loyens A, Galas M-C, Bousset L, Melki R, Auregan G, Hantraye P, Brouillet E, Buee L, Colin M (2014) Ectosomes: a new mechanism for non-exosomal secretion of tau protein. *PLoS One* 9:e100760.
 67. Coleman BM, Hanssen E, Lawson VA, Hill AF (2012) Prion-infected cells regulate the release of exosomes with distinct ultrastructural features. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 26:4160–4173.
 68. Henderson MC, Azorsa DO (2012) The genomic and proteomic content of cancer cell-derived exosomes. *Front Oncol* 2:38.
 69. Yoshioka Y, Konishi Y, Kosaka N, Katsuda T, Kato T, Ochiya T (2013) Comparative marker analysis of extracellular vesicles in different human cancer types. *J. Extracell. Vesicles* 2:20424.
 70. Guzman N, Agarwal K, Asthagiri D, Yu L, Saji M, Ringel MD, Paulaitis ME (2015) Breast Cancer-Specific miR Signature Unique to Extracellular Vesicles Includes “microRNA-like” tRNA Fragments. *Mol Cancer Res MCR* 13:891–901.
 71. Akers JC, Ramakrishnan V, Kim R, Phillips S, Kaimal V, Mao Y, Hua W, Yang I, Fu C-C, Nolan J, Nakano I, Yang Y, Beaulieu M, Carter BS, Chen CC (2015) miRNA contents of cerebrospinal fluid extracellular vesicles in glioblastoma patients. *J Neurooncol* 123:205–216.
 72. Ragusa M, Barbagallo C, Statello L, Caltabiano R, Russo A, Puzzo L, Avitabile T, Longo A, Toro MD, Barbagallo D, Valadi H, Di Pietro C, Purrello M, Reibaldi M (2015) miRNA profiling in vitreous humor, vitreal exosomes and serum from uveal melanoma patients: Pathological and diagnostic implications. *Cancer Biol Ther* 16:1387–1396.
 73. Marimpietri D, Petretto A, Raffaghello L, Pezzolo A, Gagliani C, Tacchetti C, Mauri P, Melioli G, Pistoia V (2013) Proteome profiling of neuroblastoma-derived exosomes reveal the expression of proteins potentially involved in tumor progression. *PLoS One* 8:e75054.
 74. Chiasserini D, van Weering JRT, Piersma SR, Pham TV, Malekzadeh A, Teunissen CE, de Wit H, Jimenez CR (2014) Proteomic analysis of cerebrospinal fluid extracellular vesicles: a comprehensive dataset. *J Proteomics* 106:191–204.
 75. Yao Y, Wei W, Sun J, Chen L, Deng X, Ma L, Hao S (2015) Proteomic analysis of exosomes derived from human lymphoma cells. *Eur J Med Res* 20:8.
 76. Choi DS, Choi DY, Hong BS, Jang SC, Kim DK, Lee J, Kim YK, Kim KP, Gho YS (2012) Quantitative proteomics of extracellular vesicles derived from human primary and metastatic colorectal cancer cells. *J. Extracell. Vesicles* 1:18704.
 77. D’Asti E, Garnier D, Lee TH, et al (2012) Oncogenic extracellular vesicles in brain tumor progression. *Front Physiol* 3:294.
 78. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239–257.

79. Kiraz Y, Adan A, Kartal Yandim M, Baran Y (2016) Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med*. 37:8471-8486.
80. Schultz DR, Harrington WJ (2003) Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Semin Arthritis Rheum* 32:345–369.
81. Rudin CM, Van Dongen J, Thompson CB (1996) Apoptotic signaling in lymphocytes. *Curr Opin Hematol* 3:35–40.
82. Gupta S (2001) Molecular steps of tumor necrosis factor receptor-mediated apoptosis. *Curr Mol Med* 1:317–324.
83. Atkin-Smith GK, Tixeira R, Paone S, Mathivanan S, Collins C, Liem M, Goodall KJ, Ravichandran KS, Hulett MD, Poon IKH (2015) A novel mechanism of generating extracellular vesicles during apoptosis via a beads-on-a-string membrane structure. *Nat Commun* 6:7439.
84. Crespin M, Vidal C, Picard F, Lacombe C, Fontenay M (2009) Activation of PAK1/2 during the shedding of platelet microvesicles. *Blood Coagul Fibrinolysis* 20:63–70.
85. Antwi-Baffour SS (2015) Molecular characterisation of plasma membrane-derived vesicles. *J Biomed Sci* 22:68.
86. MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Tóth E, Dower SK, North RA (2001) Rapid secretion of interleukin-1 beta by microvesicle shedding. *Immunity* 15:825–835.
87. Baroni M, Pizzirani C, Pinotti M, Ferrari D, Adinolfi E, Calzavarini S, Caruso P, Bernardi F, Di Virgilio F (2007) Stimulation of P2 (P2X(7)) receptors in human dendritic cells induces the release of tissue factor-bearing microparticles. *FASEB J* 21:1926–1933.
88. Kahner BN, Dorsam RT, Kunapuli SP (2008) Role of P2Y receptor subtypes in platelet-derived microparticle generation. *Front Biosci-Landmark* 13:433–439.
89. Wewers MD, Sarkar A (2009) P2X(7) receptor and macrophage function. *Purinergic Signal* 5:189–195.
90. Volonté C, Apolloni S, Skaper SD, Burnstock G (2012) P2X7 receptors: channels, pores and more. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 11:705–721.
91. Bartlett R, Stokes L, Sluyter R (2014) The P2X7 receptor channel: recent developments and the use of P2X7 antagonists in models of disease. *Pharmacol Rev* 66:638–675.
92. Pasquet JM, Dachary-Prigent J, Nurden AT (1998) Microvesicle release is associated with extensive protein tyrosine dephosphorylation in platelets stimulated by A23187 or a mixture of thrombin and collagen. *Biochem J* 333:591–599.
93. Qu Y, Ramachandra L, Mohr S, Franchi L, Harding CV, Nunez G, Dubyak GR (2009) P2X7 receptor-stimulated secretion of MHC class II-containing exosomes requires the ASC/NLRP3 inflammasome but is independent of caspase-1. *J Immunol Baltim Md* 1950 182:5052–5062.
94. Qu Y, Franchi L, Nunez G, Dubyak GR (2007) Nonclassical IL-1 beta secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and

- correlated with exosome release in murine macrophages. *J Immunol* 179:1913–1925.
95. Palade GE (1955) A small particulate component of the cytoplasm. *J Biophys Biochem Cytol* 1:59–68.
 96. Piper RC, Katzmann DJ (2007) Biogenesis and Function of Multivesicular Bodies. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23:519–547.
 97. Tamai K, Tanaka N, Nakano T, Kakazu E, Kondo Y, Inoue J, Shiina M, Fukushima K, Hoshino T, Sano K, Ueno Y, Shimosegawa T, Sugamura K (2010) Exosome secretion of dendritic cells is regulated by Hrs, an ESCRT-0 protein. *Biochem Biophys Res Commun* 399:384–390.
 98. Colombo M, Moita C, van Niel G, Kowal J, Vigneron J, Benaroch P, Manel N, Moita LF, Thery C, Raposo G (2013) Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J Cell Sci* 126:5553–5565.
 99. Urbanelli L, Magini A, Buratta S, Brozzi A, Sagini K, Polchi A, Tancini B, Emiliani C (2013) Signaling pathways in exosomes biogenesis, secretion and fate. *Genes* 4:152–170.
 100. Hurley JH, Boura E, Carlson LA, Rozycki B (2010) Membrane Budding. *Cell* 143:875–887.
 101. Babst M (2011) MVB vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between. *Curr Opin Cell Biol* 23:452–457.
 102. Kowal J, Tkach M, Thery C (2014) Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr Opin Cell Biol* 29:116–125.
 103. Villarroya-Beltri C, Baixauli F, Gutierrez-Vazquez C, Sanchez-Madrid F, Mittelbrunn M (2014) Sorting it out: regulation of exosome loading. *Semin Cancer Biol* 28:3–13.
 104. Bissig C, Gruenberg J (2014) ALIX and the multivesicular endosome: ALIX in Wonderland. *Trends Cell Biol* 24:19–25.
 105. Baietti MF, Zhang Z, Mortier E, Melchior A, Degeest G, Geeraerts A, Ivarsson Y, Depoortere F, Coomans C, Vermeiren E, Zimmermann P, David G (2012) Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol* 14:677–685.
 106. Friand V, David G, Zimmermann P (2015) Syntenin and syndecan in the biogenesis of exosomes. *Biol Cell Auspices Eur Cell Biol Organ* 107:331–341.
 107. Roucourt B, Meeussen S, Bao J, Zimmermann P, David G (2015) Heparanase activates the syndecan-syntenin-ALIX exosome pathway. *Cell Res* 25:412–428.
 108. Batagov AO, Kuznetsov VA, Kurochkin IV (2011) Identification of nucleotide patterns enriched in secreted RNAs as putative cis-acting elements targeting them to exosome nano-vesicles. *BMC Genomics* 12 Suppl 3:S18.
 109. Szostak N, Royo F, Rybarczyk A, Szachniuk M, Blazewicz J, del Sol A, Falcon-Perez JM (2014) Sorting signal targeting mRNA into hepatic extracellular vesicles. *RNA Biol* 11:836–844.

110. Iavello A, Frech VSL, Gai C, Deregibus MC, Quesenberry PJ, Camussi G (2016) Role of Alix in miRNA packaging during extracellular vesicle biogenesis. *Int J Mol Med* 37:958–966.
111. Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, Fanget I, Raposo G, Savina A, Moita CF, Schauer K, Hume AN, Freitas RP, Goud B, Benaroch P, Hacohen N, Fukuda M, Desnos C, Seabra MC, Darchen F, Amigorena S, Moita LF, Thery C (2010) Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol* 12:1930–1913.
112. Bobrie A, Krumeich S, Reyat F, Recchi C, Moita LF, Seabra MC, Ostrowski M, Thery C (2012) Rab27a supports exosome-dependent and -independent mechanisms that modify the tumor microenvironment and can promote tumor progression. *Cancer Res* 72:4920–4930.
113. Hyenne V, Apaydin A, Rodriguez D, Spiegelhalter C, Hoff-Yoessle S, Diem M, Tak S, Lefebvre O, Schwab Y, Goetz JG, Labouesse M (2015) RAL-1 controls multivesicular body biogenesis and exosome secretion. *J Cell Biol* 211:27–37.
114. Savina A, Furlán M, Vidal M, Colombo MI (2003) Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *J Biol Chem* 278:20083–20090.
115. Agarwal K, Saji M, Lazaroff SM, Palmer AF, Ringel MD, Paulaitis ME (2015) Analysis of exosome release as a cellular response to MAPK pathway inhibition. *Langmuir ACS J Surf Colloids* 31:5440–5448.
116. Lespagnol A, Duflaut D, Beekman C, Blanc L, Fiucci G, Marine JC, Vidal M, Amson R, Telerman A (2008) Exosome secretion, including the DNA damage-induced p53-dependent secretory pathway, is severely compromised in TSAP6/Steap3-null mice. *Cell Death Differ* 15:1723–1733.
117. Maguire JE, Silva M, Nguyen KCQ, Hellen E, Kern AD, Hall DH, Barr MM (2015) Myristoylated CIL-7 regulates ciliary extracellular vesicle biogenesis. *Mol Biol Cell* 26:2823–2832.
118. Nieuwland R, Sturk A (2010) Why do cells release vesicles? *Thromb Res* 125 Suppl 1:S49-51.
119. Verweij FJ, van Eijndhoven MAJ, Hopmans ES, Vendrig T, Wurdinger T, Cahir-McFarland E., Kieff E, Geerts D, van der Kant R, Neefjes J, Middeldorp JM, Pegtel DM (2011) LMP1 association with CD63 in endosomes and secretion via exosomes limits constitutive NF- κ B activation. *EMBO J* 30:2115–2129.
120. Lasda E, Parker R (2016) Circular RNAs Co-Precipitate with Extracellular Vesicles: A Possible Mechanism for circRNA Clearance. *PLoS One* 11:e0148407.
121. Eder C (2009) Mechanisms of interleukin-1 beta release. *Immunobiology* 214:543–553.
122. Wolf P (1967) The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma. *Br J Haematol* 13:269–288.
123. Hargett LA, Bauer NN (2013) On the origin of microparticles: From “platelet dust” to mediators of intercellular communication. *Pulm Circ* 3:329–340.

124. Burnier L, Fontana P, Kwak BR, Angelillo-Scherrer A (2009) Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. *Thromb Haemost* 101:439–451.
125. Berckmans RJ, Nieuwland R, Böing AN, Romijn FP, Hack CE, Sturk A (2001) Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb Haemost* 85:639–646.
126. Hron G, Kollars M, Weber H, Sagaster V, Quehenberger P, Eichinger S, Kyrle PA, Weltermann A (2007) Tissue factor-positive microparticles: Cellular origin and association with coagulation activation in patients with colorectal cancer. *Thromb Haemost* 97:119–123.
127. Tesselaar MET, Romijn FP, TM, Van der Linden IK, Prins FA, Bertina RM, Osanto S (2007) Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis? *J Thromb Haemost* 5:520–527.
128. Chirinos JA, Heresi GA, Velasquez H, Jy W, Jimenez JJ, Ahn E, Horstman LL, Soriano AO, Zambrano JP, Ahn YS (2005) Elevation of endothelial microparticles, platelets, and leukocyte activation in patients with venous thromboembolism. *J Am Coll Cardiol* 45:1467–1471.
129. Pereira J, Alfaro G, Goycoolea M, Quiroga, T, Ocqueteau, M, Massardo L, Perez C, Saez C, Panes O, Matus V, Mezzano D (2006) Circulating platelet-derived microparticles in systemic lupus erythematosus - Association with increased thrombin generation and procoagulant state. *Thromb Haemost* 95:94–99.
130. Dignat-George F, Camoin-Jau L, Sabatier F, Arnoux D, Anfosso F, Bardin N, Veit V, Combes V, Gentile S, Moal V, Sanmarco M, Sampol J (2004) Endothelial microparticles: a potential contribution to the thrombotic complications of the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 91:667–673.
131. Mulcahy LA, Pink RC, Carter DRF (2014) Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J. Extracell. Vesicles* 3:24641.
132. Tian T, Wang Y, Wang H, Zhu Z, Xiao Z (2010) Visualizing of the cellular uptake and intracellular trafficking of exosomes by live-cell microscopy. *J Cell Biochem* 111:488–496.
133. Tkach M, Thery C (2016) Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell* 164:1226–1232.
134. Record M, Carayon K, Poirot M, Silvente-Poirot S (2014) Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological processes. *Biochim Biophys Acta* 1841:108–120.
135. Fevrier B, Raposo G (2004) Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr Opin Cell Biol* 16:415–421.
136. Bang C, Thum T (2012) Exosomes: new players in cell-cell communication. *Int J Biochem Cell Biol* 44:2060–2064.
137. Simons M, Raposo G (2009) Exosomes - vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol* 21:575–581.
138. Gangoda L, Boukouris S, Liem M, Kalra H, Mathivanan S (2015) Extracellular vesicles including exosomes are mediators of signal transduction: are they protective or pathogenic? *Proteomics* 15:260–271.

139. Iraci N, Leonardi T, Gessler F, Vega B, Pluchino S (2016) Focus on Extracellular Vesicles: Physiological Role and Signalling Properties of Extracellular Membrane Vesicles. *Int J Mol Sci* 17:171.
140. Meckes DG, Shair KHY, Marquitz AR, Kung CP, Edwards RH, Raab-Traub N (2010) Human tumor virus utilizes exosomes for intercellular communication. *Proc Natl Acad Sci U A* 107:20370–20375.
141. Aga M, Bentz GL, Raffa S, Torrisi MR, Kondo S, Wakisaka N, Yoshizaki T, Pagano JS, Shackelford J (2014) Exosomal HIF1 α supports invasive potential of nasopharyngeal carcinoma-associated LMP1-positive exosomes. *Oncogene* 33:4613–4622.
142. Keryer-Bibens C, Pioche-Durieu C, Villemant C, Souquère S, Nishi N, Hirashima M, Middeldorp J, Busson P (2006) Exosomes released by EBV-infected nasopharyngeal carcinoma cells convey the viral Latent Membrane Protein 1 and the immunomodulatory protein galectin 9. *BMC Cancer* 6:283.
143. Lötvall J, Valadi H (2007) Cell to Cell Signalling via Exosomes Through esRNA. *Cell Adhes Migr* 1:156–158.
144. Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, Curry WT, Carter BS, Krichevsky AM, Breakefield XO (2008) Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 10:1470–1476.
145. Saha B, Momen-Heravi F, Kodys K, Szabó G (2016) MicroRNA Cargo of Extracellular Vesicles from Alcohol-exposed Monocytes Signals Naive Monocytes to Differentiate into M2 Macrophages. *J Biol Chem* 291:149–159.
146. Nishida-Aoki N, Ochiya T (2015) Interactions between cancer cells and normal cells via miRNAs in extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci CMLS* 72:1849–1861.
147. Montecalvo A, Larregina AT, Shufesky WJ, Stolz DB, Sullivan MLG, Karlsson JM, Baty CJ, Gibson GA, Erdos G, Wang Z, Milosevic J, Tkacheva OA, Divito SJ, Jordan R, Lyons-Weiler J, Watkins SC, Morelli AE (2012) Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood* 119:756–766.
148. Baj-Krzyworzeka M, Weglarczyk K, Mytar B, Szatanek R, Baran J, Zembala M (2011) Tumour-derived Microvesicles Contain Interleukin-8 and Modulate Production of Chemokines by Human Monocytes. *Anticancer Res* 31:1329–1335.
149. Farahani M, Rubbi C, Liu L, Slupsky JR, Kalakonda N (2015) CLL Exosomes Modulate the Transcriptome and Behaviour of Recipient Stromal Cells and Are Selectively Enriched in miR-202-3p. *PLoS One* 10:e0141429.
150. Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, Rak J (2008) Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol* 10:619–624.
151. Al-Nedawi K, Meehan B, Kerbel RS, Allison AC, Rak J (2009) Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:3794–3799.

152. Street JM, Birkhoff W, Menzies RI, Webb DJ, Bailey MA, Dear JW (2011) Exosomal transmission of functional aquaporin 2 in kidney cortical collecting duct cells. *J Physiol* 589:6119–6127.
153. Zhang H-G, Liu C, Su K, Yu, S, Zhang L, Zhang S, Wang J, Cao X, Grizzle W, Kimberly RP (2006) A membrane form of TNF- α presented by exosomes delays T cell activation-induced cell death. *J Immunol Baltim Md* 1950 176:7385–7393.
154. Munich S, Sobo-Vujanovic A, Buchser WJ, Beer-Stolz D, Vujanovic NL (2012) Dendritic cell exosomes directly kill tumor cells and activate natural killer cells via TNF superfamily ligands. *Oncoimmunology* 1:1074–1083.
155. Clayton A, Court J, Navabi H, Adams M, Mason MD, Hobot JA, Newman GR, Jasani B (2001) Analysis of antigen presenting cell derived exosomes, based on immuno-magnetic isolation and flow cytometry. *J Immunol Methods* 247:163–174.
156. Patel DM, Arnold PY, White GA, Nardella JP, Mannie MD (1999) Class II MHC/peptide complexes are released from APC and are acquired by T cell responders during specific antigen recognition. *J Immunol Baltim Md* 1950 163:5201–5210.
157. Buning J, von Smolinski D, Tafazzoli K, Zimmer K-P, Strobel S, Apostolaki M, Kollias G, Heath JK, Ludwig D, Gebert A (2008) Multivesicular bodies in intestinal epithelial cells: responsible for MHC class II-restricted antigen processing and origin of exosomes. *Immunology* 125:510–521.
158. Hundorfean G, Zimmer K-P, Strobel S, Gebert A, Ludwig D, Buning J (2007) Luminal antigens access late endosomes of intestinal epithelial cells enriched in MHC I and MHC II molecules: in vivo study in Crohn's ileitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293:G798-808.
159. Mallegol J, Van Niel G, Lebreton C, Lepelletier Y, Candal, C, Dugave C, Heath JK, Raposo G, Cerf-Bensussan N, Heyman M (2007) T84-intestinal epithelial exosomes bear MHC class II/peptide complexes potentiating antigen presentation by dendritic cells. *Gastroenterology* 132:1866–1876.
160. Scharztz NEC, Chaput N, Andre F, Zitvogel L (2002) From the antigen-presenting cell to the antigen-presenting vesicle: the exosomes. *Curr Opin Mol Ther* 4:372–381.
161. Luketic L, Delanghe J, Sobol PT, Yang P, Frotten E, Mossman KL, Gauldie J, Bramson J, Wan Y (2007) Antigen presentation by exosomes released from peptide-pulsed dendritic cells is not suppressed by the presence of active CTL. *J Immunol Baltim Md* 1950 179:5024–5032.
162. Chaput N, Flament C, Viaud S, Taieb J, Roux S, Spatz A, Andre F, LePecq J-B, Boussac M, Garin J, Amigorena S, Thery C, Zitvogel L (2006) Dendritic cell derived-exosomes: biology and clinical implementations. *J Leukoc Biol* 80:471–478.
163. Villarroya-Beltri C, Gutierrez-Vazquez C, Sanchez-Madrid F, Mittelbrunn M (2013) Analysis of microRNA and protein transfer by exosomes during an immune synapse. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 1024:41–51.

164. Admyre C, Bohle B, Johansson SM, Focke-Tejkl M, Valenta R, Scheynius A, Gabrielsson S (2007) B cell-derived exosomes can present allergen peptides and activate allergen-specific T cells to proliferate and produce TH2-like cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 120:1418–1424.
165. Qazi KR, Gehrmann U, Domange Jordo E, Karlsson MCI, Gabrielsson S (2009) Antigen-loaded exosomes alone induce Th1-type memory through a B-cell-dependent mechanism. *Blood* 113:2673–2683.
166. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Leijendekker R, Harding CV, Melief CJM, Geuze HJ (1996) B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 183:1161–1172.
167. Sprent J (2005) Direct stimulation of naive T cells by antigen-presenting cell vesicles. *Blood Cells Mol Dis* 35:17–20.
168. Thery C, Duban L, Segura E, Veron P, Lantz O, Amigorena S (2002) Indirect activation of naive CD4⁺ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat Immunol* 3:1156–1162.
169. Campana S, De Pasquale C, Carrega P, Ferlazzo G, Bonaccorsi I (2015) Cross-dressing: an alternative mechanism for antigen presentation. *Immunol Lett* 168:349–354.
170. Davis DM (2007) Intercellular transfer of cell-surface proteins is common and can affect many stages of an immune response. *Nat Rev Immunol* 7:238–243.
171. Pant S, Hilton H, Burczynski ME (2012) The multifaceted exosome: biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities. *Biochem Pharmacol* 83:1484–1494.
172. Corrado C, Raimondo S, Chiesi A, Ciccia F, De Leo G, Alessandro R (2013) Exosomes as intercellular signaling organelles involved in health and disease: basic science and clinical applications. *Int J Mol Sci* 14:5338–5366.
173. Mooberry MJ, Key NS (2016) Microparticle analysis in disorders of hemostasis and thrombosis. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol* 89:111–122.
174. Huber HJ, Holvoet P (2015) Exosomes: emerging roles in communication between blood cells and vascular tissues during atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 26:412–419.
175. Krohn JB, Hutcheson JD, Martinez-Martinez E, Aikawa E (2016) Extracellular vesicles in cardiovascular calcification: Expanding current paradigms. *J. Physiol.* 594:2895-2903.
176. Osteikoetxea X, Németh A, Sódar B, Vukman KV, Buzás EI (2016) Extracellular vesicles in cardiovascular diseases, are they Jedi or Sith? *J. Physiol.* 594:2881-2894.
177. Yuan M-J, Maghsoudi T, Wang T (2016) Exosomes Mediate the Intercellular Communication after Myocardial Infarction. *Int J Med Sci* 13:113–116.
178. Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV (2016) Cardiac Extracellular Vesicles in Normal and Infarcted Heart. *Int J Mol Sci* 17:63.
179. Nozaki T, Sugiyama S, Sugamura K, Ohba K, Matsuzawa Y, Konishi M, Matsubara J, Akiyama E, Sumida H, Matsui K, Jinnouchi H, Ogawa H (2010)

- Prognostic value of endothelial microparticles in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail* 12:1223–1228.
180. Bakouboula B, Morel O, Faure A, Zobairi F, Jesel L, Trinh A, Zupan M, Canuet M, Grunebaum L, Brunette A, Desprez D, Chabot F, Weitzenblum E, Freyssinet JM, Chaouat A, Toti F (2008) Procoagulant membrane microparticles correlate with the severity of pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 177:536–543.
 181. Simak J, Gelderman MP, Yu H, Wright V, Baird AE (2006) Circulating endothelial microparticles in acute ischemic stroke: a link to severity, lesion volume and outcome. *J Thromb Haemost* 4:1296–1302.
 182. Chironi G, Simon A, Hugel B, Del Pino M, Gariepy J, Freyssinet JM, Tedgui A (2006) Circulating leukocyte-derived microparticles predict subclinical atherosclerosis burden in asymptomatic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:2775–2780.
 183. Amabile N, Heiss C, Real WM, Minasi P, McGlothlin D, Rame EJ, Grossman W, De Marco T, Yeghiazarians Y (2008) Circulating endothelial microparticle levels predict hemodynamic severity of pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 177:1268–1275.
 184. Carandini T, Colombo F, Finardi A, Casella G, Garzetti L, Verderio C, Furlan R (2015) Microvesicles: What is the Role in Multiple Sclerosis? *Front Neurol* 6:111.
 185. Sáenz-Cuesta M, Irizar H, Castillo-Triviño T, Muñoz-Culla M, Osorio-Querejeta I, Prada A, Sepúlveda L, López-Mato, MP, López de Munain A, Comabella M, Villar LM, Olascoaga J, Otaegui, D (2014) Circulating microparticles reflect treatment effects and clinical status in multiple sclerosis. *Biomark Med* 8:653–661.
 186. Kawikova I, Askenase PW (2015) Diagnostic and therapeutic potentials of exosomes in CNS diseases. *Brain Res* 1617:63–71.
 187. Kanninen KM, Bister N, Koistinaho J, Malm T (2016) Exosomes as new diagnostic tools in CNS diseases. *Biochim Biophys Acta* 1862:403–410.
 188. Matsubara E, Shoji M, Murakami T, Abe K, Frangione B, Ghiso J (2002) Platelet microparticles as carriers of soluble Alzheimer's amyloid beta (sA beta). *Alzheimers Dis Vasc Etiol Pathol* 977:340–348.
 189. Porto-Carreiro I, Fevrier B, Paquet S, Vilette D, Raposo G (2005) Prions and exosomes: from PrPc trafficking to PrPsc propagation. *Blood Cells Mol Dis* 35:143–148.
 190. Balaj L, Lessard R, Dai L, Cho Y-J, Pomeroy SL, Breakefield XO, Skog J (2011) Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nat Commun* 2:180.
 191. Wurdinger T, Gatsion NN, Balaj L, Kaur B, Breakefield XO, Pegtel DM (2012) Extracellular vesicles and their convergence with viral pathways. *Adv Virol* 2012:767694.
 192. van Dongen HM, Masoumi N, Witwer KW, Pegtel DM (2016) Extracellular Vesicles Exploit Viral Entry Routes for Cargo Delivery. *Microbiol Mol Biol Rev* MMBR 80:369–386.

193. Izquierdo-Useros N, Naranjo-Gomez M, Archer J, Hatch SC, Erkizia I, Blanco J, Borrás FE, Puertas MC, Connor JH, Fernandez-Figueras MT, Moore L, Clotet B, Gummuluru S, Martinez-Picado J (2009) Capture and transfer of HIV-1 particles by mature dendritic cells converges with the exosome-dissemination pathway. *Blood* 113:2732–2741.
194. Kalamvoki M, Deschamps T (2016) Extracellular vesicles during Herpes Simplex Virus type 1 infection: an inquire. *Virology* 13:63.
195. Bautista D, Rodriguez L-S, Franco MA, Angel J, Barreto A (2015) Caco-2 cells infected with rotavirus release extracellular vesicles that express markers of apoptotic bodies and exosomes. *Cell Stress Chaperones* 20:697–708.
196. Kaparakis-Liaskos M, Ferrero RL (2015) Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles. *Nat Rev Immunol* 15:375–387.
197. Peres da Silva R, Puccia R, Rodrigues ML, Oliveira DL, Joffe LS, César GV, Nimrichter L, Goldenberg S, Alves LR (2015) Extracellular vesicle-mediated export of fungal RNA. *Sci Rep* 5:7763.
198. Schorey JS, Cheng Y, Singh PP, Smith VL (2015) Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. *EMBO Rep* 16:24–43.
199. Coakley G, Maizels RM, Buck AH (2015) Exosomes and Other Extracellular Vesicles: The New Communicators in Parasite Infections. *Trends Parasitol* 31:477–489.
200. Szempruch AJ, Sykes SE, Kieft R, Dennison L, Becker AC, Gartrell A, Martin WJ, Nakayasu ES, Almeida IC, Hajduk SL, Harrington JM (2016) Extracellular Vesicles from *Trypanosoma brucei* Mediate Virulence Factor Transfer and Cause Host Anemia. *Cell* 164:246–257.
201. Zhang Y, Zhang R, Zhang H, Liu J, Yang Z, Xu P, Cai W, Lu G, Cui M, Schwendener RA, Shi H-Z, Xiong H, Huang B (2012) Microparticles released by *Listeria monocytogenes*-infected macrophages are required for dendritic cell-elicited protective immunity. *Cell Mol Immunol* 9:489–496.
202. Singh PP, LeMaire C, Tan JC, Zeng E, Schorey JS (2011) Exosomes released from *M. tuberculosis* infected cells can suppress IFN-gamma mediated activation of naive macrophages. *PLoS One* 6:e18564.
203. Schwab A, Meyering SS, Lepene B, Iordanskiy S, van Hoek ML, Hakami RM, Kashanchi F (2015) Extracellular vesicles from infected cells: potential for direct pathogenesis. *Front Microbiol* 6:1132.
204. Schorey JS, Harding CV (2016) Extracellular vesicles and infectious diseases: new complexity to an old story. *J Clin Invest* 126:1181–1189.
205. van Bergenhenegouwen J, Kraneveld AD, Rutten L, Kettelarij N, Garssen J, Vos AP (2014) Extracellular vesicles modulate host-microbe responses by altering TLR2 activity and phagocytosis. *PLoS One* 9:e89121.
206. Fleming A, Sampey G, Chung M-C, Bailey C, van Hoek ML, Kashanchi F, Hakami RM (2014) The carrying pigeons of the cell: exosomes and their role in infectious diseases caused by human pathogens. *Pathog Dis* 71:109–120.
207. Soriano AO, Jy WC, Chirinos JA, Valdivia MA, Velasquez HS, Jimenez JJ, Horstman LL, Kett DH, Schein RMH, Ahn YS (2005) Levels of endothelial and

- platelet microparticles and their interactions with leukocytes negatively correlate with organ dysfunction and predict mortality in severe sepsis. *Crit Care Med* 33:2540–2546.
208. Buzás EI, György B, Nagy G, Falus A, Gay S (2014) Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. *Nat Rev Rheumatol* 10:356–364.
 209. Bobrie A, Colombo M, Raposo G, Thery C (2011) Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic Cph Den* 12:1659–1668.
 210. Robbins PD, Dorronsoro A, Booker CN (2016) Regulation of chronic inflammatory and immune processes by extracellular vesicles. *J Clin Invest* 126:1173–1180.
 211. Beyer C, Pisetsky DS (2010) The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 6:21–29.
 212. György B, Szabó TG, Turiák L, Wright M, Herczeg P, Ledecz Z, Kittel Á, Polgár A, Tóth K, Dérfalvi B, Zelenák G, Böröcz I, Carr B, Nagy G, Vékey K, Gay S, Falus A, Buzás EI (2012) Improved flow cytometric assessment reveals distinct microvesicle (cell-derived microparticle) signatures in joint diseases. *PLoS One* 7:e49726.
 213. Perez-Hernandez J, Cortes R (2015) Extracellular Vesicles as Biomarkers of Systemic Lupus Erythematosus. *Markers* 2015:613536.
 214. Erdbruegger U, Grossheim M, Hertel B, Wyss K, Kirsch T, Woywodt A, Haller H, Haubitz M (2008) Diagnostic role of endothelial microparticles in vasculitis. *Rheumatology* 47:1820–1825.
 215. Baka Z, Senolt L, Vencovsky J, Mann H, Simon PS, Kittel Á, Buzás E, Nagy G (2010) Increased serum concentration of immune cell derived microparticles in polymyositis/dermatomyositis. *Immunol Lett* 128:124–130.
 216. Peake PW, Pianta TJ, Succar L, Fernando M, Pugh DJ, McNamara K, Endre ZH (2014) A comparison of the ability of levels of urinary biomarker proteins and exosomal mRNA to predict outcomes after renal transplantation. *PLoS One* 9:e98644.
 217. Saadeldin IM, Oh HJ, Lee BC (2015) Embryonic-maternal cross-talk via exosomes: potential implications. *Stem Cells Cloning Adv Appl* 8:103–107.
 218. Tannetta D, Dragovic R, Alyahyaei Z, Southcombe J (2014) Extracellular vesicles and reproduction-promotion of successful pregnancy. *Cell Mol Immunol* 11:548–563.
 219. Nardi F da S, Michelon TF, Neumann J, Manvailer LFS, Wagner B, Horn PA, Bicalho M da G, Rebmann V (2016) High levels of circulating extracellular vesicles with altered expression and function during pregnancy. *Immunobiology* 221:753–760.
 220. Holder B, Jones T, Sancho Shimizu V, Rice TF, Donaldson B, Bouqueau M, Forbes K, Kampmann B (2016) Macrophage Exosomes Induce Placental Inflammatory Cytokines: A Novel Mode of Maternal-Placental Messaging. *Traffic Cph Den* 17:168–178.

221. Pap E, Pállinger E, Falus A, Kiss AA, Kittel Á, Kovács P, Buzás EI (2008) T lymphocytes are targets for platelet- and trophoblast-derived microvesicles during pregnancy. *Placenta* 29:826–832.
222. Escudero CA, Herlitz K, Troncso F, Acurio J, Aguayo C, Roberts JM, Truong G, Duncombe G, Rice G, Salomon C (2016) Role of Extracellular Vesicles and microRNAs on Dysfunctional Angiogenesis during Preeclamptic Pregnancies. *Front Physiol* 7:98.
223. Cronqvist T, Salje K, Familiar M, Guller S, Schneider H, Gardiner C, Sargent IL, Redman CW, Morgelin M, Akerstrom B, Gram M, Hansson SR (2014) Syncytiotrophoblast vesicles show altered micro-RNA and haemoglobin content after ex-vivo perfusion of placentas with haemoglobin to mimic preeclampsia. *PLoS One* 9:e90020.
224. Di Pietro C (2016) Exosome-mediated communication in the ovarian follicle. *J Assist Reprod Genet* 33:303–311.
225. Thery C (2015) Cancer: Diagnosis by extracellular vesicles. *Nature* 523:161–162.
226. Properzi F, Logozzi M, Fais S (2013) Exosomes: the future of biomarkers in medicine. *Biomark Med* 7:769–778.
227. An T, Qin S, Xu Y, Tang Y, Huang Y, Situ B, Inal JM, Zheng L (2015) Exosomes serve as tumour markers for personalized diagnostics owing to their important role in cancer metastasis. *J Extracell Vesicles* 4:27522.
228. Katsuda T, Kosaka N, Ochiya T (2014) The roles of extracellular vesicles in cancer biology: toward the development of novel cancer biomarkers. *Proteomics* 14:412–425.
229. Whiteside TL (2015) The potential of tumor-derived exosomes for noninvasive cancer monitoring. *Expert Rev Mol Diagn* 15:1293–1310.
230. Nawaz M, Camussi G, Valadi H, Nazarenko I, Ekstrom K, Wang X, Principe S, Shah N, Ashraf NM, Fatima F, Neder L, Kislinger T (2014) The emerging role of extracellular vesicles as biomarkers for urogenital cancers. *Nat Rev Urol* 11:688–701.
231. Dear JW, Street JM, Bailey MA (2013) Urinary exosomes: a reservoir for biomarker discovery and potential mediators of intrarenal signalling. *Proteomics* 13:1572–1580.
232. Hessvik NP, Sandvig K, Llorente A (2013) Exosomal miRNAs as Biomarkers for Prostate Cancer. *Front Genet* 4:36.
233. Mitchell PJ, Welton J, Staffurth J, Court J, Mason MD, Tabi Z, Clayton A (2009) Can urinary exosomes act as treatment response markers in prostate cancer? *J Transl Med* 7:4.
234. Overbye A, Skotland T, Koehler CJ, Thiede B, Seierstad T, Berge V, Sandvig K, Llorente A (2015) Identification of prostate cancer biomarkers in urinary exosomes. *Oncotarget* 6:30357–30376.
235. Nilsson J, Skog J, Nordstrand A, Baranov V, Mincheva-Nilsson L, Breakefield XO, Widmark A (2009) Prostate cancer-derived urine exosomes: a novel approach to biomarkers for prostate cancer. *Br J Cancer* 100:1603–1607.

236. Rabinowits G, Gercel-Taylor C, Day JM, Taylor DD, Kloecker GH (2009) Exosomal MicroRNA: A Diagnostic Marker for Lung Cancer. *Clin Lung Cancer* 10:42–46.
237. Santiago-Dieppa DR, Steinberg J, Gonda D, Cheung VJ, Carter BS, Chen CC (2014) Extracellular vesicles as a platform for “liquid biopsy” in glioblastoma patients. *Expert Rev Mol Diagn* 14:819–825.
238. Ogata-Kawata H, Izumiya M, Kurioka D, Honma Y, Yamada Y, Furuta K, Gunji T, Ohta H, Okamoto H, Sonoda H, Watanabe M, Nakagama H, Yokota J, Kohno T, Tsuchiya N (2014) Circulating Exosomal microRNAs as Biomarkers of Colon Cancer. *PLOS ONE* 9:e92921.
239. Szajnik M, Derbis M, Lach M, Patalas P, Michalak M, Drzewiecka H, Szpurek D, Nowakowski A, Spaczynski M, Baranowski W, Whiteside TL (2013) Exosomes in Plasma of Patients with Ovarian Carcinoma: Potential Biomarkers of Tumor Progression and Response to Therapy. *Gynecol Obstet Sunnyvale Calif Suppl* 4:3.
240. Taylor DD, Gercel-Taylor C (2008) MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 110:13–21.
241. O’Loughlin AJ, Woffindale CA, Wood MJA (2012) Exosomes and the emerging field of exosome-based gene therapy. *Curr Gene Ther* 12:262–274.
242. Tan A, Rajadas J, Seifalian AM (2013) Exosomes as nano-theranostic delivery platforms for gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 65:357–367.
243. Lamichhane TN, Raiker RS, Jay SM (2015) Exogenous DNA Loading into Extracellular Vesicles via Electroporation is Size-Dependent and Enables Limited Gene Delivery. *Mol Pharm* 12:3650–3657.
244. Maguire CA, Balaj L, Sivaraman S, Crommentuijn MHW, Ericsson M, Mincheva-Nilsson L, Baranov V, Gianni D, Tannous BA, Sena-Esteves M, Breakefield XO, Skog J (2012) Microvesicle-associated AAV vector as a novel gene delivery system. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther* 20:960–971.
245. Vader P, Mol EA, Pasterkamp G, Schiffelers RM (2016) Extracellular vesicles for drug delivery. *Adv Drug Deliv. Rev* 106:148-156.
246. Ren J, He W, Zheng L, Duan H (2016) From structures to functions: insights into exosomes as promising drug delivery vehicles. *Biomater Sci* 4:910-921.
247. Saari H, Lazaro-Ibanez E, Viitala T, Vuorimaa-Laukkanen E, Siljander P, Yliperttula M (2015) Microvesicle- and exosome-mediated drug delivery enhances the cytotoxicity of Paclitaxel in autologous prostate cancer cells. *J Control Release Off J Control Release Soc* 220:727–737.
248. Batrakova EV, Kim MS (2015) Using exosomes, naturally-equipped nanocarriers, for drug delivery. *J Control Release Off J Control Release Soc* 219:396–405.
249. Hall J, Prabhakar S, Balaj L, Lai CP, Cerione RA, Breakefield XO (2016) Delivery of Therapeutic Proteins via Extracellular Vesicles: Review and Potential Treatments for Parkinson’s Disease, Glioma, and Schwannoma. *Cell Mol Neurobiol* 36:417-427.
250. Fuster-Matanzo A, Gessler F, Leonardi T, Iraci N, Pluchino S (2015) Acellular approaches for regenerative medicine: on the verge of clinical trials with extracellular membrane vesicles? *Stem Cell Res Ther* 6:227.

251. Nawaz M, Fatima F, Vallabhaneni KC, Penfornis P, Valadi H, Ekstrom K, Kholia S, Whitt JD, Fernandes JD, Pochampally R, Squire JA, Camussi G (2016) Extracellular Vesicles: Evolving Factors in Stem Cell Biology. *Stem Cells Int* 2016:1073140.
252. Burke J, Kolhe R, Hunter M, Isales C, Hamrick M, Fulzele S (2016) Stem Cell-Derived Exosomes: A Potential Alternative Therapeutic Agent in Orthopaedics. *Stem Cells Int* 2016:5802529.
253. Katsuda T, Kosaka N, Takeshita F, Ochiya T (2013) The therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *Proteomics* 13:1637–1653.
254. Sahoo S, Klychko E, Thorne T, Misener S, Schultz KM, Millay M, Ito A, Liu T, Kamide C, Agrawal H, Perlman H, Qin G, Kishore R, Losordo DW (2011) Exosomes from human CD34(+) stem cells mediate their proangiogenic paracrine activity. *Circ Res* 109:724–728.
255. Kim D-K, Nishida H, An SY, Shetty AK, Bartosh TJ, Prockop DJ (2016) Chromatographically isolated CD63+CD81+ extracellular vesicles from mesenchymal stromal cells rescue cognitive impairments after TBI. *Proc Natl Acad Sci U A* 113:170–175.
256. Andre F, Chaput N, Scharzt NEC, Flament C, Aubert N, Bernard J, Lemonnier F, Raposo G, Escudier B, Hsu D-H, Tursz T, Amigorena S, Angevin E, Zitvogel L (2004) Exosomes as potent cell-free peptide-based vaccine. I. Dendritic cell-derived exosomes transfer functional MHC class I/peptide complexes to dendritic cells. *J Immunol Baltim Md* 172:2126–2136.
257. Cheng Y, Schorey JS (2013) Exosomes carrying mycobacterial antigens can protect mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Eur J Immunol* 43:3279–3290.
258. Di Bonito P, Ridolfi B, Columba-Cabezas S, Giovannelli A, Chiozzini C, Manfredi F, Anticoli S, Arenaccio C, Federico M (2015) HPV-E7 delivered by engineered exosomes elicits a protective CD8(+) T cell-mediated immune response. *Viruses* 7:1079–1099.
259. Schnitzer JK, Berzel S, Fajardo-Moser M, Remer KA, Moll H (2010) Fragments of antigen-loaded dendritic cells (DC) and DC-derived exosomes induce protective immunity against *Leishmania major*. *Vaccine* 28:5785–5793.
260. Bell BM, Kirk ID, Hiltbrunner S, Gabrielsson S, Bultema JJ (2016) Designer exosomes as next-generation cancer immunotherapy. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med* 12:163–169.
261. Rountree RB, Mandl SJ, Nachtwey JM, Dalpozzo K, Do L, Lombardo JR, Schoonmaker PL, Brinkmann K, Dirmeier U, Laus R, Delcayre A (2011) Exosome targeting of tumor antigens expressed by cancer vaccines can improve antigen immunogenicity and therapeutic efficacy. *Cancer Res* 71:5235–5244.
262. Zeelenberg IS, Ostrowski M, Krumeich S, Bobrie A, Jancic C, Boissonnas A, Delcayre A, Le Pecq J-B, Combadiere B, Amigorena S, Thery C (2008) Targeting tumor antigens to secreted membrane vesicles in vivo induces efficient antitumor immune responses. *Cancer Res* 68:1228–1235.

263. Gu X, Erb U, Buchler MW, Zoller M (2015) Improved vaccine efficacy of tumor exosome compared to tumor lysate loaded dendritic cells in mice. *Int J Cancer* 136:E74-84.
264. Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, Wolfers J, Flament C, Tenza D, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Amigorena S (1998) Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med* 4:594–600.
265. Li X, Li JJ, Yang JY, Wang DS, Zhao W, Song WJ, Li WM, Wang JF, Han W, Zhang ZC, Yu Y, Cao DY, Dou KF (2012) Tolerance induction by exosomes from immature dendritic cells and rapamycin in a mouse cardiac allograft model. *PLoS One* 7:e44045.
266. Lener T, Gimona M, Aigner L, Börger V, Buzás E, Camussi G, Chaput N, Chatterjee D, Court FA, del Portillo HA, O'Driscoll L, Fais S, Falcon-Perez JM, Felderhoff-Mueser U, Fraile L, Gho YS, Görgens A, Gupta RC, Hendrix A, Hermann DM, Hill AF, Hochberg F, Horn PA, de Kleijn D, Kordelas L, Kramer BW, Krämer-Albers E-M, Laner-Plamberger S, Laitinen S, Leonardi T, Lorenowicz MJ, Lim SK, Lötvall J, Maguire CA, Marcilla A, Nazarenko I, Ochiya T, Patel T, Pedersen S, Pocsfalvi G, Pluchino S, Quesenberry P, Reischl IG, Rivera FJ, Sanzenbacher R, Schallmoser K, Slaper-Cortenbach I, Strunk D, Tonn T, Vader P, van Balkom BWM, Wauben M, Andaloussi SE, Thery C, Rohde E, Giebel B (2015) Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials – an ISEV position paper. *J Extracell Vesicles* 4:30087.
267. György B, Hung ME, Breakefield XO, Leonard JN (2015) Therapeutic applications of extracellular vesicles: clinical promise and open questions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 55:439–64.
268. Fais S, O'Driscoll L, Borrás FE, Buzás E, Camussi G, Cappello F, Carvalho J, Cordeiro da Silva A, Del Portillo H, El Andaloussi S, Ficko Trcek T, Furlan R, Hendrix A, Gursel I, Kralj-Iglic V, Kaeffer B, Kosanovic M, Lekka ME, Lipps G, Logozzi M, Marcilla A, Sammar M, Llorente A, Nazarenko I, Oliveira C, Pócsfalvi G, Rajendran L, Raposo G, Rohde E, Siljander P, van Niel G, Vasconcelos MH, Yanez-Mo M, Yliperttula ML, Zarovni N, Zavec AB, Giebel B (2016) Evidence-Based Clinical Use of Nanoscale Extracellular Vesicles in Nanomedicine. *ACS Nano*
269. Nolan JP (2015) Flow Cytometry of Extracellular Vesicles: Potential, Pitfalls, and Prospects. *Curr Protoc Cytom* 73:13.14.1-16.
270. van der Pol E, van Gemert MJC, Sturk A, Nieuwland R, van Leeuwen TG (2012) Single vs. swarm detection of microparticles and exosomes by flow cytometry. *J Thromb Haemost* 10:919–930.
271. György B, Módos K, Pállinger E, Pálóczi K, Pásztói M, Misják, P, Deli MA, Sipos A, Szalai A, Voszka I, Polgár A, Tóth K, Csete M, Nagy G, Gay S, Falus A, Kittel Á, Buzás EI (2011) Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters. *Blood* 117:E39–E48.

272. György B, Pálóczi K, Kovács A, Barabás E, Bekő G, Várnai K, Pállinger É, Szabó-Taylor K, Szabó TG, Kiss AA, Falus A, Buzás EI (2014) Improved circulating microparticle analysis in acid-citrate dextrose (ACD) anticoagulant tube. *Thromb Res* 133:285–292.
273. Xu R, Greening DW, Zhu H-J, Takahashi N, Simpson RJ (2016) Extracellular vesicle isolation and characterization: toward clinical application. *J Clin Invest* 126:1152–1162.
274. Mora EM, Alvarez-Cubela S, Oltra E (2015) Biobanking of Exosomes in the Era of Precision Medicine: Are We There Yet? *Int J Mol Sci* 17:13.
275. Yuana Y, Boing AN, Grootemaat AE, van der Pol E, Hau CM, Cizmar P, Buhr E, Sturk A, Nieuwland R (2015) Handling and storage of human body fluids for analysis of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 4:29260.
276. Lacroix R, Robert S, Poncelet P, Kasthuri RS, Key NS, Dignat-George F (2010) Standardization of platelet-derived microparticle enumeration by flow cytometry with calibrated beads: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop. *J Thromb Haemost* 8:2571–2574.
277. Robert S, Poncelet P, Lacroix R, Arnaud, L., Giraudo, L., Hauchard, A., Sampol, J., Dignat-George, F (2009) Standardization of platelet-derived microparticle counting using calibrated beads and a Cytomics FC500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies? *J Thromb Haemost* 7:190–197.
278. Chandler WL, Yeung W, Tait JF (2011) A new microparticle size calibration standard for use in measuring smaller microparticles using a new flow cytometer. *J Thromb Haemost* 9:1216–1224.
279. Stoner SA, Duggan E, Condello D, Guerrero A, Turk JR, Narayanan PK, Nolan JP (2016) High sensitivity flow cytometry of membrane vesicles. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol* 89:196–206.
280. Groot Kormelink T, Arkesteijn GJA, Nauwelaers FA, van den Engh G, Nolte-'t Hoen ENM, Wauben MHM (2016) Prerequisites for the analysis and sorting of extracellular vesicle subpopulations by high-resolution flow cytometry. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol* 89:135–147.
281. Pospichalova V, Svoboda J, Dave Z, Kotrbova A, Kaiser K, Klemova D, Ilkovics L, Hampl A, Crha I, Jandakova E, Minar L, Weinberger V, Bryja V (2015) Simplified protocol for flow cytometry analysis of fluorescently labeled exosomes and microvesicles using dedicated flow cytometer. *J Extracell Vesicles* 4:25530.
282. van der Pol E, Hoekstra AG, Sturk A, Otto C, van Leeuwen TG, Nieuwland R (2010) Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *J Thromb Haemost* 8:2596–2607.
283. Shao H, Chung J, Lee K, Balaj L, Min C, Carter BS, Hochberg FH, Breakefield XO, Lee H, Weissleder R (2015) Chip-based analysis of exosomal mRNA mediating drug resistance in glioblastoma. *Nat Commun* 6:6999.
284. Akagi T, Kato K, Kobayashi M, Kosaka N, Ochiya T, Ichiki T (2015) On-chip immunoelectrophoresis of extracellular vesicles released from human breast cancer cells. *PLoS One* 10:e0123603.

285. Jo W, Jeong D, Kim J, Cho S, Jang SC, Han C, Kang JY, Gho YS, Park J (2014) Microfluidic fabrication of cell-derived nanovesicles as endogenous RNA carriers. *Lab Chip* 14:1261–1269.
286. Chen C, Skog J, Hsu CH, Lessard RT, Balaj L, Wurdinger T, Carter BS, Breakefield XO, Toner M, Irimia D (2010) Microfluidic isolation and transcriptome analysis of serum microvesicles. *Lab Chip* 10:505–511.
287. Koliha N, Wiencek Y, Heider U, Jungst C, Kladt N, Krauthauser S, Johnston ICD, Bosio A, Schauss A, Wild S (2016) A novel multiplex bead-based platform highlights the diversity of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 5:29975.
288. Ueda K, Ishikawa N, Tatsuguchi A, Saichi N, Fujii R, Nakagawa H (2014) Antibody-coupled monolithic silica microtips for highthroughput molecular profiling of circulating exosomes. *Sci Rep* 4:6232.
289. Gagni P, Cretich M, Benussi L, Tonoli E, Ciani M, Ghidoni R, Santini B, Galbiati E, Prosperi D, Chiari M (2016) Combined mass quantitation and phenotyping of intact extracellular vesicles by a microarray platform. *Anal Chim Acta* 902:160–167.
290. Jorgensen M, Baek R, Pedersen S, Sondergaard EKL, Kristensen SR, Varming K (2013) Extracellular Vesicle (EV) Array: microarray capturing of exosomes and other extracellular vesicles for multiplexed phenotyping. *J. Extracell. Vesicles* 2:20920.
291. Wyss R, Grasso L, Wolf C, Grosse W, Demurtas D, Vogel H (2014) Molecular and dimensional profiling of highly purified extracellular vesicles by fluorescence fluctuation spectroscopy. *Anal Chem* 86:7229–7233.
292. Chen C, Lin B-R, Hsu M-Y, Cheng C-M (2015) Paper-based devices for isolation and characterization of extracellular vesicles. *J Vis Exp* e52722.
293. Webber J, Stone TC, Katilius E, Smith BC, Gordon B, Mason MD, Tabi Z, Brewis IA, Clayton A (2014) Proteomics analysis of cancer exosomes using a novel modified aptamer-based array (SOMAscan) platform. *Mol Cell Proteomics MCP* 13:1050–1064.
294. Patkó D, György B, Németh A, Szabó-Taylor KE, Kittel Á, Buzás EI, Horváth R (2013) Label-free optical monitoring of surface adhesion of extracellular vesicles by grating coupled interferometry. *Sens Actuators B-Chem* 188:697–701.
295. Zhu L, Wang K, Cui J, Liu H, Bu X, Ma H, Wang W, Gong H, Lausted C, Hood L, Yang G, Hu Z (2014) Label-free quantitative detection of tumor-derived exosomes through surface plasmon resonance imaging. *Anal Chem* 86:8857–8864.
296. Prada I, Amin L, Furlan R, Legname G, Verderio C, Cojoc D (2016) A new approach to follow a single extracellular vesicle-cell interaction using optical tweezers. *Biotechniques* 60:35–41.
297. Grasso L, Wyss R, Weidenauer L, Thampi A, Demurtas D, Prudent M, Lion N, Vogel H (2015) Molecular screening of cancer-derived exosomes by surface plasmon resonance spectroscopy. *Anal Bioanal Chem* 407:5425–5432.
298. Im H, Shao H, Weissleder R, Castro CM, Lee H (2015) Nano-plasmonic exosome diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 15:725–733.

299. Yuana Y, Koning RI, Kuil ME, Rensen PCN, Koster AJ, Bertina RM, Osanto S (2013) Cryo-electron microscopy of extracellular vesicles in fresh plasma. *J Extracell Vesicles* 2:21494.
300. Tatischeff I, Larquet E, Falcón-Pérez JM, Turpin P-Y, Kruglik SG (2012) Fast characterisation of cell-derived extracellular vesicles by nanoparticles tracking analysis, cryo-electron microscopy, and Raman tweezers microspectroscopy. *J Extracell Vesicles* 1:19179.
301. Arraud N, Linares R, Tan S, Gounou C, Pasquet J-M, Mornet S, Brisson AR (2014) Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *J Thromb Haemost* 12:614–627.
302. Fertig ET, Gherghiceanu M, Popescu LM (2014) Extracellular vesicles release by cardiac telocytes: electron microscopy and electron tomography. *J Cell Mol Med* 18:1938–1943.
303. Sharma S, Rasool HI, Palanisamy V, Mathisen C, Schmidt M, Wong DT, Gimzewski JK (2010) Structural- mechanical characterization of nanoparticles- Exosomes in human saliva, using correlative AFM, FESEM and force spectroscopy. *ACS Nano* 4:1921–1926.
304. Palanisamy V, Sharma S, Deshpande A, Zhou H, Gimzewski J, Wong DT (2010) Nanostructural and Transcriptomic Analyses of Human Saliva Derived Exosomes. *PLOS ONE* 5:e8577.
305. Lawrie AS, Albanyan A, Cardigan RA, Mackie IJ, Harrison P (2009) Microparticle sizing by dynamic light scattering in fresh-frozen plasma. *Vox Sang* 96:206–212.
306. de Vrij J, Maas SLN, van Nispen M, Sena-Estevés M, Limpens RWA, Koster AJ, Leenstra S, Lamfers ML, Broekman MLD (2013) Quantification of nanosized extracellular membrane vesicles with scanning ion occlusion sensing. *Nanomed* 8:1443–1458.
307. Koritzinsky EH, Street JM, Star RA, Yuen PST (2016) Quantification of Exosomes. *J Cell Physiol* (ePub, DOI: 10.1002/jcp.25387)
308. Maas SLN, de Vrij J, van der Vlist EJ, Geragousian B, van Bloois L, Mastrobattista E, Schiffelers RM, Wauben MHM, Broekman MLD, Nolte-’t Hoen ENM (2015) Possibilities and limitations of current technologies for quantification of biological extracellular vesicles and synthetic mimics. *J Control Release Off J Control Release Soc* 200:87–96.
309. Varga Z, Yuana Y, Grootemaat AE, van der Pol E, Gollwitzer C, Krumrey M, Nieuwland R (2014) Towards traceable size determination of extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles* 3:23298
310. Sverdlov ED (2012) Amedeo Avogadro’s cry: what is 1 microg of exosomes? *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol* 34:873–875.
311. Chevillet JR, Kang Q, Ruf IK, Briggs HA, Vojtech LN, Hughes SM, Cheng HH, Arroyo JD, Meredith EK, Gallichotte EN, Pogossova-Agadjanyan EL, Morrissey C, Stirewalt DL, Hladik F, Yu EY, Higano CS, Tewari M (2014) Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes. *Proc Natl Acad Sci U A* 111:14888–14893.

312. Rani S, O'Brien K, Kelleher FC, Corcoran C, Germano S, Radomski MW, Crown J, O'Driscoll L (2011) Isolation of exosomes for subsequent mRNA, MicroRNA, and protein profiling. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 784:181–195.
313. Lässer C, Eldh M, Lötvall J (2012) Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. *J Vis Exp* 59:e3037.
314. Crossland RE, Norden J, Bibby LA, Davis J, Dickinson AM (2016) Evaluation of optimal extracellular vesicle small RNA isolation and qRT-PCR normalisation for serum and urine. *J Immunol Methods* 429:39–49.
315. Van Deun J, Mestdagh P, Sormunen R, Cocquyt V, Vermaelen K, Vandesompele J, Bracke M, De Wever O, Hendrix A (2014) The impact of disparate isolation methods for extracellular vesicles on downstream RNA profiling. *J. Extracell. Vesicles* 3:24858.
316. Dignat-George F, Freyssinet JM, Key NS (2009) Centrifugation is a crucial step impacting microparticle measurement. *Platelets* 20:PII 911103756.
317. Jeppesen DK, Hvam ML, Primdahl-Bengtson B, Boysen AT, Whitehead B, Dyrskjot L, Orntoft TF, Howard KA, Ostensfeld MS (2014) Comparative analysis of discrete exosome fractions obtained by differential centrifugation. *J Extracell Vesicles* 3:25011.
318. Bobrie A, Colombo M, Krumeich S, Raposo G, Thery C (2012) Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation. *J. Extracell. Vesicles* 1:18397
319. Royo F, Zuniga-Garcia P, Sanchez-Mosquera P, Egia A, Perez A, Loizaga A, Arceo R, Lacasa I, Rabade A, Arrieta E, Bilbao R, Unda M, Carracedo A, Falcon-Perez JM (2016) Different EV enrichment methods suitable for clinical settings yield different subpopulations of urinary extracellular vesicles from human samples. *J Extracell Vesicles* 5:29497.
320. Livshits MA, Khomyakova E, Evtushenko EG, Lazarev VN, Kulemin NA, Semina SE, Generozov EV, Govorun VM (2015) Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. *Sci Rep* 5:17319.
321. Cvjetkovic A, Lötvall J, Lässer C (2014) The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles* 3:23111.
322. Fernandez-Llama P, Khositseth S, Gonzales PA, Star RA, Pisitkun T, Knepper MA (2010) Tamm-Horsfall protein and urinary exosome isolation. *Kidney Int* 77:736–742.
323. Zonneveld MI, Brisson AR, van Herwijnen MJC, Tan S, van de Lest CHA, Redegeld FA, Garssen J, Wauben MHM, Nolte-'t Hoen ENM (2014) Recovery of extracellular vesicles from human breast milk is influenced by sample collection and vesicle isolation procedures. *J. Extracell. Vesicles* 3:24215.
324. Abramowicz A, Widlak P, Pietrowska M (2016) Proteomic analysis of exosomal cargo: the challenge of high purity vesicle isolation. *Mol Biosyst* 12:1407-1419.

325. Gudbergsson JM, Johnsen KB, Skov MN, Duroux M (2015) Systematic review of factors influencing extracellular vesicle yield from cell cultures. *Cytotechnology* 68:579-592.
326. Thery C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A (2006) Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* 3:3.22.
327. Gonzales PA, Zhou H, Pisitkun T, Wang NS, Star RA, Knepper MA, Yuen PST (2010) Isolation and purification of exosomes in urine. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 641:89–99.
328. Muller L, Hong C-S, Stolz DB, Watkins SC, Whiteside TL (2014) Isolation of biologically-active exosomes from human plasma. *J Immunol Methods* 411:55–65.
329. Szatanek R, Baran J, Siedlar M, Baj-Krzyworzeka M (2015) Isolation of extracellular vesicles: Determining the correct approach. *Int J Mol Med* 36:11–17.
330. Lobb RJ, Becker M, Wen SW, Wong CSF, Wiegman AP, Leimgruber A, Moller A (2015) Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *J Extracell Vesicles* 4:27031.
331. Zeringer E, Barta T, Li M, Vlassov AV (2015) Strategies for isolation of exosomes. *Cold Spring Harb Protoc* 2015:319–323.
332. de Menezes-Neto A, Saez MJF, Lozano-Ramos I, Segui-Barber J, Martin-Jaular L, Ullate JME, Fernandez-Becerra C, Borrás FE, Del Portillo HA (2015) Size-exclusion chromatography as a stand-alone methodology identifies novel markers in mass spectrometry analyses of plasma-derived vesicles from healthy individuals. *J Extracell Vesicles* 4:27378.
333. Nordin JZ, Lee Y, Vader P, Mager I, Johansson HJ, Heusermann W, Wiklander OPB, Hallbrink M, Seow Y, Bultema JJ, Gilthorpe J, Davies T, Fairchild PJ, Gabrielsson S, Meisner-Kober NC, Lehtio J, Smith CIE, Wood MJA, El Andaloussi S (2015) Ultrafiltration with size-exclusion liquid chromatography for high yield isolation of extracellular vesicles preserving intact biophysical and functional properties. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med* 11:879–883.
334. Baranyai T, Herczeg K, Ónódi Z, Voszka I, Módos K, Marton N, Nagy G, Mager I, Wood MJ, El Andaloussi S, Palinkás Z, Kumar V, Nagy P, Kittel Á, Buzás EI, Ferdinándy P, Giricz Z (2015) Isolation of Exosomes from Blood Plasma: Qualitative and Quantitative Comparison of Ultracentrifugation and Size Exclusion Chromatography Methods. *PLoS One* 10:e0145686.
335. Gallart-Palau X, Serra A, Wong ASW, Sandin S, Lai MKP, Chen CP, Kon OL, Sze SK (2015) Extracellular vesicles are rapidly purified from human plasma by Protein Organic Solvent Precipitation (PROSPR). *Sci Rep* 5:14664.
336. Shin H, Han C, Labuz JM, Kim J, Kim J, Cho S, Cho YS, Takayama S, Park J (2015) High-yield isolation of extracellular vesicles using aqueous two-phase system. *Sci Rep* 5:13103.
337. Kim J, Shin H, Kim J, Kim J, Park J (2015) Isolation of High-Purity Extracellular Vesicles by Extracting Proteins Using Aqueous Two-Phase System. *PLoS One* 10:e0129760.

338. Shih CL, Chong KY, Hsu SC, Chi HJ, Ma CT, Chang JWC, Yu CJ, Chiou CC (2016) Development of a magnetic bead-based method for the collection of circulating extracellular vesicles. *New Biotechnol* 33:116–122.
339. Lee K, Shao H, Weissleder R, Lee H (2015) Acoustic purification of extracellular microvesicles. *ACS Nano* 9:2321–2327.
340. van der Meel R, Krawczyk-Durka M, van Solinge WW, Schiffelers RM (2014) Toward routine detection of extracellular vesicles in clinical samples. *Int J Lab Hematol* 36:244–253.
341. Saenz-Cuesta M, Arbelaiz A, Oregi A, Irizar H, Osorio-Querejeta I, Munoz-Culla M, Banales JM, Falcon-Perez JM, Olascoaga J, Otaegui D (2015) Methods for extracellular vesicles isolation in a hospital setting. *Front Immunol* 6:50.
342. Connor DE, Exner T, Ma DDF, Joseph JE (2009) Detection of the procoagulant activity of microparticle-associated phosphatidylserine using XACT. *Blood Coagul Fibrinolysis Int J Haemost Thromb* 20:558–564.
343. Freyssinet J-M, Toti F (2010) Formation of procoagulant microparticles and properties. *Thromb Res* 125 Suppl 1:S46-48.
344. Smalheiser NR (2007) Exosomal transfer of proteins and RNAs at synapses in the nervous system. *Biol Direct* 2:1–15.
345. Faure V, Dou L, Sabatier F, Cerini C, Sampol J, Berland Y, Brunet P, Dignat-George F (2006) Elevation of circulating endothelial microparticles in patients with chronic renal failure. *J Thromb Haemost* 4:566–573.
346. Lachenal G, Pernet-Gallay K, Chivet M, Hemming, F.J., Belly, A., Bodon, G., Blot, B., Haase, G., Goldberg Y, Sadoul R (2011) Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity. *Mol Cell Neurosci* 46:409–418.
347. Chivet M, Javalet C, Laulagnier K, Blot B, Hemming FJ, Sadoul R (2014) Exosomes secreted by cortical neurons upon glutamatergic synapse activation specifically interact with neurons. *J Extracell Vesicles*. 3:24722
348. Korkut C, Ataman B, Ramachandran P, Ashley, J., Barria R, Gherbesi N, Budnik V (2009) Trans-synaptic transmission of vesicular Wnt signals through Evi/Wntless. *Cell* 139:393–404.
349. Gross JC, Chaudhary V, Bartscherer K, Boutros M (2012) Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nat Cell Biol* 14:1036–1045.
350. Koles K, Nunnari J, Korkut C, Barria R, Brewer C, Li Y, Leszyk J, Zhang B, Budnik V (2012) Mechanism of evenness interrupted (Evi)-exosome release at synaptic boutons. *J Biol Chem* 287:16820–16834.
351. Koles K, Budnik V (2012) Exosomes go with the Wnt. *Cell Logist* 2:169–173.
352. Bahrini I, Song J, Diez D, Hanayama R (2015) Neuronal exosomes facilitate synaptic pruning by up-regulating complement factors in microglia. *Sci Rep* 5:7989.
353. Norcross MA (1984) A synaptic basis for T-lymphocyte activation. *Ann Immunol* 135D:113–134.
354. Ortega-Carrion A, Vicente-Manzanares M (2016) Concerning immune synapses: a spatiotemporal timeline. *F1000Research* 5:418.

355. Xie J, Tato CM, Davis MM (2013) How the immune system talks to itself: the varied role of synapses. *Immunol Rev* 251:65–79.
356. Dustin ML, Chakraborty AK, Shaw AS (2010) Understanding the structure and function of the immunological synapse. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a002311.
357. Kuokkanen E, Šuštar V, Mattila PK (2015) Molecular control of B cell activation and immunological synapse formation. *Traffic Cph Den* 16:311–326.
358. Yokosuka T, Saito T (2009) Dynamic regulation of T-cell costimulation through TCR-CD28 microclusters. *Immunol Rev* 229:27–40.
359. Alarcón B, Mestre D, Martínez-Martín N (2011) The immunological synapse: a cause or consequence of T-cell receptor triggering? *Immunology* 133:420–425.
360. Lee K-H, Holdorf AD, Dustin ML, Chan AC, Allen PM, Shaw AS (2002) T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science* 295:1539–1542.
361. Choudhuri K, Llodrá J, Roth EW, Tsai J, Gordo S, Wucherpennig KW, Kam LC, Stokes DL, Dustin ML (2014) Polarized release of T-cell-receptor-enriched microvesicles at the immunological synapse. *Nature* 507:118–123.
362. Dustin ML (2014) What counts in the immunological synapse? *Mol Cell* 54:255–562.
363. Yeh Y-Y, Ozer HG, Lehman AM, Maddocks K, Yu L, Johnson AJ, Byrd JC (2015) Characterization of CLL exosomes reveals a distinct microRNA signature and enhanced secretion by activation of BCR signaling. *Blood* 125:3297–3305.
364. Alegre E, Rebmann V, Lemaoult J, Rodriguez C, Horn PA, Diaz-Lagares A, Echeveste JI, Gonzalez A (2013) In vivo identification of an HLA-G complex as ubiquitinated protein circulating in exosomes. *Eur J Immunol* 43:1933–1939.
365. Qu Y, Ramachandra L, Mohr S, Franchi L, Harding CV, Nunez G, Dubyak GR (2009) P2X7 Receptor-stimulated secretion of MHC Class II-containing exosomes requires the ASC/NLRP3 inflammasome but is independent of caspase-1. *J Immunol* 182:5052–5062.
366. Rocha-Perugini V, Sanchez-Madrid F, Martinez Del Hoyo G (2015) Function and Dynamics of Tetraspanins during Antigen Recognition and Immunological Synapse Formation. *Front Immunol* 6:653.
367. Petersen SH, Odintsova E, Haigh TA, Rickinson AB, Taylor GS, Berditchevski F (2011) The role of tetraspanin CD63 in antigen presentation via MHC class II. *Eur J Immunol* 41:2556–2561.
368. Viaud S, Thery C, Ploix S, Tursz T, Lapierre V, Lantz O, Zitvogel L, Chaput N (2010) Dendritic cell-derived exosomes for cancer immunotherapy: what's next? *Cancer Res* 70:1281–1285.
369. Campos JH, Soares RP, Ribeiro K, Andrade AC, Batista WL, Torrecilhas AC (2015) Extracellular Vesicles: Role in Inflammatory Responses and Potential Uses in Vaccination in Cancer and Infectious Diseases. *J Immunol Res* 2015:832057.

370. Segura E, Amigorena S, Thery C (2005) Mature dendritic cells secrete exosomes with strong ability to induce antigen-specific effector immune responses. *Blood Cells Mol Dis* 35:89–93.
371. Utsugi-Kobukai S, Fujimaki H, Hotta C, Nakazawa M, Minami M (2003) MHC class I-mediated exogenous antigen presentation by exosomes secreted from immature and mature bone marrow derived dendritic cells. *Immunol Lett* 89:125–131.
372. Montecalvo A, Shufesky WJ, Stolz DB, Sullivan MG, Wang Z, Divito SJ, Papworth GD, Watkins SC, Robbins PD, Larregina AT, Morelli AE (2008) Exosomes as a short-range mechanism to spread alloantigen between dendritic cells during T cell allorecognition. *J Immunol Baltim Md 1950* 180:3081–90.
373. Robbins PD, Morelli AE (2014) Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat Rev Immunol* 14:195–208.
374. Segura E, Guerin C, Hogg N, Amigorena S, Thery C (2007) CD8+ dendritic cells use LFA-1 to capture MHC-peptide complexes from exosomes in vivo. *J Immunol Baltim Md 1950* 179:1489–1496.
375. Segura E, Nicco C, Lombard B, Veron P, Raposo G, Batteux F, Amigorena S, Thery C (2005) ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T-cell priming. *Blood* 106:216–23.
376. Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S (2002) Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 20:621–667.
377. Rechavi O, Goldstein I, Kloog Y (2009) Intercellular exchange of proteins: The immune cell habit of sharing. *FEBS Lett* 583:1792–1799.
378. Izquierdo-Useros N, Naranjo-Gomez M, Erkizia I, Puertas MC, Borrás FE, Blanco J, Martínez-Picado J (2010) HIV and mature dendritic cells: Trojan exosomes riding the Trojan horse? *PLoS Pathog* 6:e1000740.
379. Wakim LM, Bevan MJ (2011) Cross-dressed dendritic cells drive memory CD8+ T-cell activation after viral infection. *Nature* 471:629–632.
380. Nakayama M (2014) Antigen Presentation by MHC-Dressed Cells. *Front Immunol* 5:672.
381. Skogberg G, Telemo E, Ekwall O (2015) Exosomes in the Thymus: Antigen Transfer and Vesicles. *Front Immunol* 6:366.
382. Millet V, Naquet P, Guinamard RR (2008) Intercellular MHC transfer between thymic epithelial and dendritic cells. *Eur J Immunol* 38:1257–1263.
383. Scanu A, Molnarfi N, Brandt KJ, Gruaz L, Dayer JM, Burger D (2008) Stimulated T cells generate microparticles, which mimic cellular contact activation of human monocytes: differential regulation of pro- and anti-inflammatory cytokine production by high-density lipoproteins. *J Leukoc Biol* 83:921–927.
384. Mittelbrunn M, Gutierrez-Vazquez C, Villarroya-Beltri C, Gonzalez S, Sanchez-Cabo F, Gonzalez MA, Bernad A, Sanchez-Madrid F (2011) Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun* 2:282.

385. Dustin ML (2014) What counts in the immunological synapse? *Mol Cell* 54:255–262.
386. Nazimek K, Ptak W, Nowak B, Ptak M, Askenase PW, Bryniarski K (2015) Macrophages play an essential role in antigen-specific immune suppression mediated by T CD8(+) cell-derived exosomes. *Immunology* 146:23–32.
387. Szabó GT, Tarr B, Pálóczi K, Éder K, Lajkó E, Kittel Á, Tóth S, György B, Pásztói M, Németh A, Osteikoetxea X., Pállinger É, Falus A, Szabó-Taylor K, Buzás EI (2014) Critical role of extracellular vesicles in modulating the cellular effects of cytokines. *Cell Mol Life Sci CMLS* 71:4055–4067.
388. Wahlgren J, Karlson TDL, Glader P, Telemo E, Valadi H (2012) Activated human T cells secrete exosomes that participate in IL-2 mediated immune response signaling. *PLoS One* 7:e49723.
389. Redzic JS, Kendrick AA, Bahmed K, Dahl KD, Pearson CG, Robinson WA, Robinson SE, Graner MW, Eisenmesser EZ (2013) Extracellular vesicles secreted from cancer cell lines stimulate secretion of MMP-9, IL-6, TGF-beta1 and EMMPRIN. *PLoS One* 8:e71225.
390. Cerri C, Chimenti D, Conti I, Neri T, Paggiaro P, Celi A (2006) Monocyte/macrophage-derived microparticles up-regulate inflammatory mediator synthesis by human airway epithelial cells. *J Immunol* 177:1975–1980.
391. Distler JHW, Jungel A, Huber LC, Seemayer CA, Reich CF, Gay RE, Michel BA, Fontana A, Gay S, Pisetsky DS, Distler O (2005) The induction of matrix metalloproteinase and cytokine expression in synovial fibroblasts stimulated with immune cell microparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:2892–2897.
392. Moscicki RA, Amento EP, Krane SM, Kurnick JT, Colvin RB (1983) Modulation of surface-antigens of a human monocyte cell-line, U937, during incubation with lymphocyte-T-conditioned medium - detection of T4-antigen and its presence on normal blood monocytes. *J Immunol* 131:743–748.
393. Huse M, Lillemeier BF, Kuhns MS, Chen DS, Davis MM (2006) T cells use two directionally distinct pathways for cytokine secretion. *Nat Immunol* 7:247–255.
394. Croft M (2009) The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nat Rev Immunol* 9:271–285.
395. Croft M (2014) The TNF Family in T cell Differentiation and Function – Unanswered Questions and Future Directions. *Semin Immunol* 26:183–190.
396. Idriss HT, Naismith JH (2000) TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech* 50:184–195.
397. Kowalczyk D, Mytar B, Jasiński M, Pryjma J, Zembala M (1995) Modulation of monocyte antigen-presenting capacity by tumour necrosis factor-alpha (TNF): opposing effects of exogenous TNF before and after an antigen pulse and the role of TNF gene activation in monocytes. *Immunol Lett* 44:51–57.
398. Zembala M, Kowalczyk D, Pryjma J, Ruggiero I, Mytar B, Klysik J, Stec WJ (1990) The role of tumor necrosis factor in the regulation of antigen presentation by human monocytes. *Int Immunol* 2:337–342.
399. Croft M (2003) Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat Rev Immunol* 3:609–620.

400. Watts TH (2005) TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu Rev Immunol* 23:23–68.
401. Vinay DS, Kwon BS (2009) TNF superfamily: costimulation and clinical applications. *Cell Biol Int* 33:453–465.
402. Zhang H, Yan D, Shi X, Liang H, Pang Y, Qin N, Chen H, Wang J, Yin B, Jiang X, Feng W, Zhang W, Zhou M, Li Z (2008) Transmembrane TNF- α mediates “forward” and “reverse” signaling, inducing cell death or survival via the NF- κ B pathway in Raji Burkitt lymphoma cells. *J Leukoc Biol* 84:789–797.
403. Xin L, Wang J, Zhang H, Shi W, Yu M, Li Q, Jiang X, Gong F, Gardner K, Li QQ, Li Z (2006) Dual regulation of soluble tumor necrosis factor- α induced activation of human monocytic cells via modulating transmembrane TNF- α -mediated “reverse signaling”. *Int J Mol Med* 18:885–892.
404. Müller S, Rihs S, Schneider JMD, Paredes BE, Seibold I, Brunner T, Müller C (2009) Soluble TNF- α but not transmembrane TNF- α sensitizes T cells for enhanced activation-induced cell death. *Eur J Immunol* 39:3171–3180.
405. Croft M (2009) The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nat Rev Immunol* 9:271–285.
406. Juhász K, Buzás K, Duda E (2013) Importance of reverse signaling of the TNF superfamily in immune regulation. *Expert Rev Clin Immunol* 9:335–348.
407. Levine SJ (2008) Molecular mechanisms of soluble cytokine receptor generation. *J Biol Chem* 283:14177–14181.
408. Hawari FI, Rouhani FN, Cui X, Yu ZX, Buckley C, Kaler M, Levine SJ (2004) Release of full-length 55-kDa TNF receptor 1 in exosome-like vesicles: A mechanism for generation of soluble cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:1297–1302.
409. Cossetti C, Iraci N, Mercer TR, Leonardi T, Alpi E, Drago D, Alfaro-Cervello C, Saini HK, Davis MP, Schaeffer J, Vega B, Stefanini M, Zhao C, Muller W, Garcia-Verdugo JM, Mathivanan S, Bachi A, Enright AJ, Mattick JS, Pluchino S (2014) Extracellular vesicles from neural stem cells transfer IFN- γ via Ifngr1 to activate Stat1 signaling in target cells. *Mol Cell* 56:193–204.
410. Monaco C, Nanchahal J, Taylor P, Feldmann M (2015) Anti-TNF therapy: past, present and future. *Int Immunol* 27:55–62.
411. Kalliolias GD, Ivashkiv LB (2016) TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol* 12:49–62.
412. Croft M, Benedict CA, Ware CF (2013) Clinical targeting of the TNF and TNFR superfamilies. *Nat Rev Drug Discov* 12:147–168.
413. Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH (2012) Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood* 119:651–665.
414. Linares R, Tan S, Gounou C, Arraud N, Brisson AR (2015) High-speed centrifugation induces aggregation of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 4:29509.
415. Kolowos W, Gaipf US, Sheriff A, Voll RE, Heyder P, Kern P, Kalden JR, Herrmann M (2005) Microparticles shed from different antigen-presenting cells

- display an individual pattern of surface molecules and a distinct potential of allogeneic T-cell activation. *Scand J Immunol* 61:226–233.
416. van der Pol E, van Gemert MJC, Sturk A, Nieuwland R, van Leeuwen TG (2012) Single vs. swarm detection of microparticles and exosomes by flow cytometry. *J Thromb Haemost* 10:919–930.
 417. Gardiner C, Ferreira YJ, Dragovic RA, Redman CWG, Sargent IL (2013) Extracellular vesicle sizing and enumeration by nanoparticle tracking analysis. *J Extracell Vesicles* 2:19671.
 418. de Vrij J, Maas SLN, van Nispen M, Sena-Esteves M, Limpens RWA, Koster AJ, Leenstra S, Lamfers ML, Broekman MLD (2013) Quantification of nanosized extracellular membrane vesicles with scanning ion occlusion sensing. *Nanomed* 8:1443–1458.
 419. Mi H, Poudel S, Muruganujan A, Casagrande JT, Thomas PD (2016) PANTHER version 10: expanded protein families and functions, and analysis tools. *Nucleic Acids Res* 44:D336–342.
 420. Mi H, Muruganujan A, Casagrande JT, Thomas PD (2013) Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. *Nat Protoc* 8:1551–1566.
 421. Fabregat A, Sidiropoulos K, Garapati P, Gillespie M, Hausmann K, Haw R, Jassal B, Jupe S, Korninger F, McKay S, Matthews L, May B, Milacic M, Rothfels K, Shamovsky V, Webber M, Weiser J, Williams M, Wu G, Stein L, Hermjakob H, D'Eustachio P (2016) The Reactome pathway Knowledgebase. *Nucleic Acids Res* 44:D481–487.
 422. Croft D, Mundo AF, Haw R, Milacic M, Weiser J, Wu G, Caudy M, Garapati P, Gillespie M, Kamdar MR, Jassal B, Jupe S, Matthews L, May B, Palatnik S, Rothfels K, Shamovsky V, Song H, Williams M, Birney E, Hermjakob H, Stein L, D'Eustachio P (2014) The Reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Res* 42:D472–477.
 423. Mostafavi S, Ray D, Warde-Farley D, Grouios C, Morris Q (2008) GeneMANIA: a real-time multiple association network integration algorithm for predicting gene function. *Genome Biol* 9:S4.
 424. Montojo J, Zuberi K, Rodriguez H, Kazi F, Wright G, Donaldson SL, Morris Q, Bader GD (2010) GeneMANIA Cytoscape plugin: fast gene function predictions on the desktop. *Bioinformatics* 26:2927–2928.
 425. Warde-Farley D, Donaldson SL, Comes O, Zuberi K, Badrawi R, Chao P, Franz M, Grouios C, Kazi F, Lopes CT, Maitland A, Mostafavi S, Montojo J, Shao Q, Wright G, Bader GD, Morris Q (2010) The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic Acids Res* 38:W214–W220.
 426. Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N (2011) miRWalk - Database: Prediction of possible miRNA binding sites by “walking” the genes of three genomes. *J Biomed Inf* 44:839–847.
 427. Dweep H, Gretz N (2015) miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nat Methods* 12:697.

428. Liu Z-P, Wu C, Miao H, Wu H (2015) RegNetwork: an integrated database of transcriptional and post-transcriptional regulatory networks in human and mouse. Database 2015:bav095.
429. Han H, Shim H, Shin D, Shim JE, Ko Y, Shin J, Kim H, Cho A, Kim E, Lee T, Kim H, Kim K, Yang S, Bae D, Yun A, Kim S, Kim CY, Cho HJ, Kang B, Shin S, Lee I (2015) TRRUST: a reference database of human transcriptional regulatory interactions. Sci Rep 5:11432.
430. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert, B.L., Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP (2005) Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. Proc Natl Acad Sci U A 102:15545–15550.
431. Liberzon A, Subramanian A, Pinchback R, Thorvaldsdottir H, Tamayo P, Mesirov JP (2011) Molecular signatures database (MSigDB) 3.0. Bioinformatics 27:1739–1740.
432. Kim DK, Kang B, Kim OY, Choi, DS, Lee J, Kim SR, Go G, Yoon YJ, Kim JH, Jang SC, Park KS, Choi EJ, Kim KP, Desiderio DM, Kim YK, Lötvall J, Hwang D, Gho YS (2013) EVpedia: an integrated database of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles. J. Extracell. Vesicles 2:20384.
433. Kim DK, Lee J, Kim SR, Choi, D.-S., Yoon, Y.J., Kim, J.H., Go, G., Nhung, D., Hong, K., Jang, S.C., Kim, S.-H., Park, K.-S., Kim, O.Y., Park, H.T., Seo, J.H., Aikawa, E., Baj-Krzyworzeka, M., van Balkom, B.W.M., Belting, M., Blanc, L., Bond V, Bongiovanni A, Borrás FE, Buee L, Buzás EI, Cheng L, Clayton A, Cocucci E, Dela Cruz CS, Desiderio DM, Di Vizio D, Ekstrom K, Falcon-Perez JM, Gardiner C, Giebel B, Greening DW, Gross JC, Gupta D, Hendrix A, Hill AF, Hill MM, Nolte-'t Hoen E, Hwang DW, Inal J, Jagannadham MV, Jayachandran M, Jee YK, Jorgensen M, Kim KP, Kim YK, Kislinger T, Lässer C, Lee, DS, Lee H, van Leeuwen J, Lener T, Liu ML, Lötvall J, Marcilla A, Mathivanan S, Moller A, Morhayim J, Mullier F, Nazarenko I, Nieuwland R, Nunes DN, Pang K, Park J, Patel T, Pocsfalvi G, Del Portillo H, Putz U, Ramirez MI, Rodrigues ML, Roh TY, Royo F, Sahoo S, Schiffelers R, Sharma S, Siljander P, Simpson RJ, Soekmadji C, Stahl P, Stensballe A, Stepien E, Tahara H, Trummer A, Valadi H, Vella LJ, Wai SN, Witwer K, Yanez-Mo M, Youn H, Zeidler R, Gho YS (2015) EVpedia: a community web portal for extracellular vesicles research. Bioinforma Oxf Engl 31:933–939.
434. Guido van R (1995) Python tutorial. Tech. Rep. CS-R9526 Cent. Voor Wiskd. En Inform. CWI
435. Cock PJA, Antao T, Chang JT, Chapman BA, Cox CJ, Dalke A, Friedberg I, Hamelryck T, Kauff F, Wilczynski B, de Hoon MJL (2009) Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. Bioinforma Oxf Engl 25:1422–1423.
436. Takamori S, Holt M, Stenius K, Lemke EA, Grønborg M, Riedel D, Urlaub H, Schenck S, Brügger B, Ringler P, Müller SA, Rammner B, Gräter F, Hub JS, De Groot BL, Mieskes G, Moriyama Y, Klingauf J, Grubmüller H, Heuser J,

- Wieland F, Jahn R (2006) Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* 127:831–846.
437. Martínez L, Andrade R, Birgin EG, Martínez JM (2009) PACKMOL: a package for building initial configurations for molecular dynamics simulations. *J Comput Chem* 30:2157–2164.
 438. Schrödinger, LLC (2015) The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8.
 439. Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, et al (2014) SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res* 42:W252–258.
 440. Stewart-Jones GBE, McMichael AJ, Bell JI, Stuart DI, Jones EY (2003) A structural basis for immunodominant human T cell receptor recognition. *Nat Immunol* 4:657–663.
 441. Hyo J, Seung J, Sang J, Suk-Kyeong J (2007) Crystal Structure of Enolase1 alpha. *Protein Data Bank* 2008:2PSN.
 442. Faehnle CR, Elkayam E, Haase AD, Hannon GJ, Joshua-Tor L (2013) The making of a slicer: activation of human Argonaute-1. *Cell Rep* 3:1901–1909.
 443. Dallas A, Moore PB (1997) The loop E-loop D region of Escherichia coli 5S rRNA: the solution structure reveals an unusual loop that may be important for binding ribosomal proteins. *Struct Lond Engl* 1993 5:1639–1653.
 444. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T (2003) Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res* 13:2498–2504.
 445. Smoot ME, Ono K, Ruscheinski J, Wang P-L, Ideker T (2011) Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. *Bioinforma Oxf Engl* 27:431–432.
 446. Merico D, Isserlin R, Stueker O, Emili A, Bader GD (2010) Enrichment Map: A Network-Based Method for Gene-Set Enrichment Visualization and Interpretation. *PLoS One* 5:e13984.
 447. Oesper L, Merico D, Isserlin R, Bader GD (2011) WordCloud: a Cytoscape plugin to create a visual semantic summary of networks. *Source Code Biol Med* 6:7.
 448. Hunter JD (2007) Matplotlib: A 2D graphics environment. *Comput Sci Eng* 9:90–95.
 449. Gargalovic PS, Imura M, Zhang B, Gharavi NM, Clark MJ, Pagnon J, Yang WP, He AQ, Truong A, Patel S, Nelson SF, Horváth S, Berliner JA, Kirchgessner TG, Lusis AJ (2006) Identification of inflammatory gene modules based on variations of human endothelial cell responses to oxidized lipids. *Proc Natl Acad Sci U A* 103:12741–12746.
 450. Prokopi M, Pula G, Mayr U, Devue C, Gallagher J, Xiao Q, Boulanger CM, Westwood N, Urbich C, Willeit J, Steiner M, Breuss J, Xu QB, Kiechl S, Mayr M (2009) Proteomic analysis reveals presence of platelet microparticles in endothelial progenitor cell cultures. *Blood* 114:723–732.

451. Garcia S, Chirinos J, Jimenez J, Munoz FD, Canoniero M, Jy W, Jimenez J, Horstman L, Ahn Y (2005) Phenotypic assessment of endothelial microparticles in patients with heart failure and after heart transplantation: Switch from cell activation to apoptosis. *J Heart Lung Transpl* 24:2184–2189.
452. Dean WL, Lee MJ, Cummins TD, Schultz DJ, Powell DW (2009) Proteomic and functional characterisation of platelet microparticle size classes. *Thromb Haemost* 102:711–718.
453. Banfi C, Brioschi M, Wait R, Begum S, Gianazza E, Pirillo A, Mussoni L, Tremoli E (2005) Proteome of endothelial cell-derived procoagulant microparticles. *Proteomics* 5:4443–4455.
454. Peterson DB, Sander T, Kaul S, Wakim BT, Halligan B, Twigger S, Pritchard KA, Oldham KT, Ou JS (2008) Comparative proteomic analysis of PAI-1 and TNF-alpha-derived endothelial microparticles. *Proteomics* 8:2430–2446.
455. Miguet L, Pacaud K, Felden C, Hugel B, Martinez MC, Freyssinet J-M, Herbrecht R, Potier N, van Dorsselaer A, Mauvieux L (2006) Proteomic analysis of malignant lymphocyte membrane microparticles using double ionization coverage optimization. *Proteomics* 6:153–171.
456. Tauro BJ, Greening DW, Mathias RA, Ji H, Mathivanan S, Scott AM, Simpson RJ (2012) Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes. *Methods San Diego Calif* 56:293–304.
457. Szabó-Taylor K, Ryan B, Osteikoetxea X, Szabó TG, Sódar B, Holub M, Németh A, Pálóczi K, Pállinger É, Winyard P, Buzás EI (2015) Oxidative and other posttranslational modifications in extracellular vesicle biology. *Semin Cell Dev Biol* 40:8–16.
458. Trexler M, Bányai L, Patthy L (2001) A human protein containing multiple types of protease-inhibitory modules. *Proc Natl Acad Sci U A* 98:3705–3709.
459. Munro S, Thomas KL, Abushaar M (1993) Molecular Characterization of a Peripheral Receptor for Cannabinoids. *Nature* 365:61–65.
460. Casanova ML, Blazquez C, Martinez-Palacio J, Villanueva C, Fernandez-Acenero MJ, Huffman JW, Jorcano JL, Guzman M (2003) Inhibition of skin tumor growth and angiogenesis in vivo by activation of cannabinoid receptors. *J Clin Invest* 111:43–50.
461. Fitzcharles MA, McDougall J, Ste-Marie PA, Padjen I (2012) Clinical implications for cannabinoid use in the rheumatic diseases: Potential for help or harm? *Arthritis Rheum* 64:2417–2425.
462. Gertsch J (2008) Anti-inflammatory cannabinoids in diet. *Commun Integr Biol* 1:26–28.
463. Krishnamoorthy L, Bess JW, Preston AB, Nagashima K, Mahal LK (2009) HIV-1 and microvesicles from T cells share a common glycome, arguing for a common origin. *Nat Chem Biol* 5:244–250.
464. Alenquer M, Amorim MJ (2015) Exosome Biogenesis, Regulation, and Function in Viral Infection. *Viruses* 7:5066–5083.

465. Magis C, van der Sloot AM, Serrano L, Notredame C (2012) An improved understanding of TNFL/TNFR interactions using structure-based classifications. *Trends Biochem Sci* 37:353–363.
466. Winkel C, Neumann S, Surulescu C, Scheurich P (2012) A minimal mathematical model for the initial molecular interactions of death receptor signalling. *Math Biosci Eng MBE* 9:663–83.
467. Kumar A, Abbas W, Herbein G (2013) TNF and TNF receptor superfamily members in HIV infection: new cellular targets for therapy? *Mediat Inflamm* 2013:484378.
468. MacEwan DJ (2002) TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signal* 14:477–492.
469. Xanthoulea S, Pasparakis M, Kousteni S, Brakebusch C, Wallach D, Bauer J, Lassmann H, Kollias G (2004) Tumor necrosis factor (TNF) receptor shedding controls thresholds of innate immune activation that balance opposing TNF functions in infectious and inflammatory diseases. *J Exp Med* 200:367–376.
470. Ismail N, Wang YJ, Dakhllallah D, Moldovan L, Agarwal K, Batte K, Shah P, Wisler J, Eubank TD, Tridandapani S, Paulaitis ME, Piper MG, Marsh CB (2013) Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer. *Blood* 121:984–995.
471. O’Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D (2010) Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol* 10:111–122.
472. Miller YI, Choi SH, Wiesner P, Fang LH, Harkewicz R, Hartvigsen K, Boullier A, Gonen A, Diehl CJ, Que XC, Montano E, Shaw PX, Tsimikas S, Binder CJ, Witztum JL (2011) Oxidation-Specific Epitopes Are Danger-Associated Molecular Patterns Recognized by Pattern Recognition Receptors of Innate Immunity. *Circ Res* 108:235–248.
473. Greenberg ME, Sun MJ, Zhang RL, Febbraio M, Silverstein R, Hazen SL (2006) Oxidized phosphatidylserine-CD36 interactions play an essential role in macrophage-dependent phagocytosis of apoptotic cells. *J Exp Med* 203:2613–2625.
474. Tait JF, Smith C (1999) Phosphatidylserine receptors: Role of CD36 in binding of anionic phospholipid vesicles to monocytic cells. *J Biol Chem* 274:3048–3054.
475. Osteikoetxea X, Balogh A, Szabó-Taylor K, Németh A, Szabó TG, Pálóczi K, Sódar B, Kittel Á, György B, Pállinger É, Matkó J, Buzás EI (2015) Improved characterization of EV preparations based on protein to lipid ratio and lipid properties. *PLoS One* 10:e0121184.

10 Saját publikációk jegyzéke

10.1 A dolgozat témájához kapcsolódó közlemények

Szabó TG, Tarr B, Pálóczi K, Éder K, Lajkó E, Kittel Á, Tóth S, György B, Pásztói M, Németh A, Osteikoetxea X, Pállinger É, Falus A, Szabó-Taylor K, Buzás EI (2014)

Critical role of extracellular vesicles in modulating the cellular effects of cytokines. CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES 71: 4055-67. **IF: 5,808**

György B, Szabó TG, Turiák L, Wright M, Herczeg P, Ledecz Z, Kittel Á, Polgar A, Tóth K, Dérfalvi B, Zelenák G, Böröcz I, Carr B, Nagy G, Vékey K, Gay S, Falus A, Buzás EI (2012) **Improved Flow Cytometric Assessment Reveals Distinct Microvesicle (Cell-Derived Microparticle) Signatures in Joint Diseases** PLOS ONE 7:e49726. **IF: 4,092**

Turiák L, Misják P, Szabó TG, Aradi B, Pálóczi K, Ozohanics O, Drahos L, Kittel Á, Falus A, Buzás EI, Vékey K (2011) **Proteomic characterization of thymocyte-derived microvesicles and apoptotic bodies in BALB/c mice** JOURNAL OF PROTEOMICS 74:2025-2033. **IF: 4,878**

György B*, Szabó TG*, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, László V, Pállinger É, Pap E, Kittel A, Nagy G, Falus A, Buzás EI (2011) **Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles** CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES 68:2667-2688.

10.2 A dolgozat témájához nem kapcsolódó közlemények

Horváti K, Bösze S, Gideon HP, Bacsá B, Szabó TG, Goliath R, Rangaka MX, Hudecz F, Wilkinson RJ, Wilkinson KA (2016) **Population tailored modification of tuberculosis specific interferon-gamma release assay.** JOURNAL OF INFECTION 72:179-188. **IF: 1,75**

Crescitelli R, Lässer C, Szabó TG, Kittel Á, Eldh M, Dianzani I, Buzás EI, Lötvall J (2013) **Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes** JOURNAL OF EXTRACELLULAR VESICLES 2:20677.

Misják P, Bösze S, Horváti K, Pásztói M, Pálóczi K, Holub MC, Szakács F, Aradi B, György B, Szabó TG, Nagy G, Glant TT, Mikecz K, Falus A, Buzás EI (2013) **The role of citrullination of an immunodominant proteoglycan (PG) aggrecan T cell epitope in BALB/c mice with PG-induced arthritis.** IMMUNOLOGY LETTERS 152:25-31. **IF: 2,526**

Szabó TG, Palotai R, Antal P, Tokatly I, Tóthfalusi L, Lund O, Nagy G, Falus A, Buzás EI (2009) **Critical role of glycosylation in determining the length and structure of T cell epitopes.** IMMUNOME RESEARCH 5:4.

11 Köszönetnyilvánítás

Szeretném köszönetemet kifejezni mindazoknak, aki doktori tanulmányaim során segítettek munkámat és hozzájárultak jelen dolgozat elkészültéhez.

Dr Buzás Edit professzorasszonynak, témavezetőmnek szakmai iránymutatásáért, támogatásáért és azért, hogy lehetővé tette számomra a doktori dolgozatomhoz szükséges kísérletek a Genetikai-, Sejt és Immunbiológiai Intézetben elvégzését.

Dr. Falus András professzor úrnak szakmai és személyes támogatásáért.

Dr. Vásárhelyi Barna professzor úrnak azért, hogy a Laboratóriumi Medicina Intézetben dolgozva a rezidensképzés mellett is folytathattam a doktori értekezés befejezéséhez szükséges munkát.

Dr. Szabó-Taylor Katalinnak a kísérletek tervezésében, kivitelezésében és az eredmények értékelésében nyújtott folyamatos segítségéért.

Pálóczi Krisztinának a kísérletek kivitelezésében nyújtott segítségéért.

A Genetikai-, Sejt- és Immunbiológiai Intézet és a Laboratóriumi Medicina Intézet minden dolgozójának.

Barátnőmnek, Müller Klaudiának türelméért, bátorításáért és személyes támogatásáért.

Testvéremnek, Szabó Csenger Márknak az informatikai kérdésekkel kapcsolatos kreatív meglátásaiért.

Szüleimnek.